

Estudo da resposta imunológica induzida por  
proteínas libertadas por promastigotas de  
*Leishmania infantum*

Ricardo Luís Lucas da Silva Rosa

Lisboa 2005

Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical



Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor no Ramo das Ciências Biomédicas,  
especialidade de Parasitologia, pela Universidade Nova de Lisboa, Instituto de  
Higiene e Medicina Tropical (IHMT).

Este trabalho foi realizado na Unidade de Leishmanioses, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, sob orientação da Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes, de Outubro de 2001 a Setembro de 2004. O financiamento foi concedido pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através da bolsa de doutoramento SFRH/BD/997/2000 e do projecto POCTI/CVT/37759/2001, participado pelo fundo comunitário europeu FEDER.



À Unidade de Leishmanioses

À minha família e amigos

## ÍNDICE

|  |               |
|--|---------------|
| <b>AGRADECIMENTOS</b>  | <b>XII</b>    |
| <b>SUMÁRIO</b>   | <b>XIV</b>    |
| <b>SUMMARY</b>   | <b>XVI</b>    |
| <b>OBJECTIVO</b>   |               |
| <b>XVIII</b>   |               |
| <b>ABREVIATURAS</b>  | <b>XIX</b>    |
| <br><b>CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO</b>  | <br><b>1</b>  |
| <br><b>1. Epidemiologia das Leishmanioses</b>                            | <br><b>2</b>  |
| 1.1. Leishmaniose cutânea e mucocutânea                                  | 5             |
| 1.2. Leishmaniose visceral   | 10            |
| 1.3. Leishmaniose visceral na Bacia Mediterrânea                         | 12            |
| 1.4. Leishmaniose em Portugal  | 13            |
| <br><b>2. Biologia do Parasita</b>                                       | <br><b>17</b> |
| 2.1. Taxonomia   | 17            |
| 2.2. Morfologia  | 19            |
| 2.3. Ciclo de vida   | 20            |
| <br><b>3. Interacção Parasita-Hospedeiro</b>                             | <br><b>24</b> |
| 3.1. Modelos animais   | 25            |
| 3.2. Resposta imunológica inata  | 26            |
| 3.2.1. Resistência aos componentes citotóxicos do soro                   | 26            |
| 3.2.2. Sobrevivência nas células do hospedeiro vertebrado                | 28            |
| 3.3. Resposta imunológica adquirida                                      | 29            |
| 3.3.1. Apresentação antigénica e indução de uma resposta<br>Linfocitária | 30            |
| 3.3.2. As células T  | 31            |

|   |               |
|---|---------------|
| 3.3.3. A produção de citocinas  | 34            |
| 3.4. Factores de virulência   | 36            |
| <b>4. Estratégias de controlo das leishmanioses</b>   | <b>38</b>     |
| 4.1. Controlo do vector   | 39            |
| 4.2. Métodos de diagnóstico das leishmanioses   | 39            |
| 4.2.1. Diagnóstico parasitológico   | 39            |
| 4.2.2. Diagnóstico seroimunológico  | 40            |
| 4.3. Tratamento das leishmanioses   | 42            |
| 4.4. Profilaxia   | 43            |
| <br><b>CAPÍTULO II. MATERIAL E MÉTODOS</b>  | <br><b>47</b> |
| <br><b>1. Animais, parasitas e antígenos</b>  | <br><b>49</b> |
| 1.1. Obtenção de promastigotas virulentos de <i>L. infantum</i>   | 49            |
| 1.2. Preparação de antígeno solúvel de <i>L. infantum</i>   | 50            |
| 1.3. Obtenção dos sobrenadantes de culturas de promastigotas de <i>L. infantum</i>                              | 51            |
| 1.4. Isolamento de fracções proteicas libertadas por <i>L. infantum</i>   | 51            |
| 1.4.1. SDS-PAGE – Separação das fracções proteicas  | 51            |
| 1.4.2. Electroeluição – Isolamento das fracções proteicas   | 52            |
| 1.4.3. Coloração por nitrato de prata   | 53            |
| 1.4.4. Quantificação proteica – Método de Lowry   | 53            |
| 1.4.5. “Immunoblot”   | 54            |
| <b>2. Análise da actividade imunogénica das fracções proteicas libertadas por <i>L. infantum</i> (in vitro)</b> | <b>55</b>     |
| 2.1. Infecção experimental  | 56            |
| 2.2. Recolha de material biológico  | 56            |
| 2.3. Determinação da carga parasitária no baço  | 56            |
| 2.4. Isolamento e quantificação de leucócitos mononucleares   | 57            |
| 2.5. Cultura de leucócitos mononucleares - Proliferação Linfocitária  | 58            |
| 2.6. Quantificação relativa por PCR em tempo real de mRNA de  |               |



|   |           |
|---|-----------|
| IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4   | 58        |
| 2.6.1. Extracção de RNA e transcrição reversa   | 60        |
| 2.6.2. Ensaio de “Real-time” PCR  | 61        |
| 2.7. Quantificação da produção das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4, por ELISA em “Sandwich”   | 62        |
| <b>3. Avaliação da resposta das subpopulações linfocitárias T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> quando estimuladas pelas fracções proteicas libertadas por <i>L. infantum</i></b> | <b>64</b> |
| 3.1. Infecção experimental  | 64        |
| 3.2. Recolha de material biológico  | 64        |
| 3.3. Isolamento das subpopulações linfocitárias T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup>   | 64        |
| 3.4. Análise da expressão e produção das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4  | 65        |
| <b>4. Imunização de murganhos BALB/c com as fracções proteicas High e Low</b>   | <b>66</b> |
| 4.1. Protocolo de imunização e infecção   | 66        |
| 4.2. Recolha de material biológico  | 66        |
| <b>5. Análise estatística</b>   | <b>67</b> |
| <b>CAPÍTULO III. RESULTADOS</b>   | <b>69</b> |
| <b>1. Fracções proteicas libertadas por <i>L. infantum</i></b>  | <b>70</b> |
| 1.1. Recolha de sobrenadantes de cultura de <i>L. infantum</i>  | 70        |
| 1.2. Identificação das fracções proteicas libertadas por <i>L. infantum</i>   | 71        |
| <b>2. Avaliação dos efeitos das proteínas libertadas por <i>L. infantum</i> na resposta imunológica do hospedeiro</b>   | <b>73</b> |
| 2.1. Densidade parasitária  | 73        |
| 2.2 Efeito das fracções proteicas na indução de Proliferação  |           |

|   |     |
|---|-----|
| Linfocitária  | 73  |
| 2.2.1. Linfócitos totais  | 74  |
| 2.2.2. Células CD4 <sup>+</sup> e CD4 <sup>-</sup>              | 75  |
| 2.2.3. Células CD8 <sup>+</sup> e CD8 <sup>-</sup>              | 78  |
| 2.3. Indução da expressão de citocinas pelas fracções proteicas | 78  |
| 2.3.1. Linfócitos totais  | 78  |
| 2.3.1.1. IL-12  | 78  |
| 2.3.1.2. IFN $\gamma$   | 79  |
| 2.3.1.3. IL-10  | 80  |
| 2.3.1.4. IL-4   | 81  |
| 2.3.2. Células CD4 <sup>+</sup> e CD4 <sup>-</sup>              | 83  |
| 2.3.2.1. IL-12  | 83  |
| 2.3.2.2. IFN $\gamma$   | 84  |
| 2.3.2.3. IL-10  | 86  |
| 2.3.2.4. IL-4   | 86  |
| 2.3.3. Células CD8 <sup>+</sup> e CD8 <sup>-</sup>              | 86  |
| 2.3.3.1. IL-12  | 86  |
| 2.3.3.2. IFN $\gamma$   | 88  |
| 2.3.3.3. IL-10  | 90  |
| 2.3.3.4. IL-4   | 91  |
| 2.4. Indução da produção de citocinas pelas fracções proteicas  | 92  |
| 2.4.1. Linfócitos totais  | 92  |
| 2.4.1.1. IL-12  | 92  |
| 2.4.1.2. IFN $\gamma$   | 93  |
| 2.4.1.3. IL-10  | 94  |
| 2.4.1.4. IL-4   | 96  |
| 2.4.2. Células CD4 <sup>+</sup> e CD4 <sup>-</sup>              | 97  |
| 2.4.2.1. IL-12  | 97  |
| 2.4.2.2. IFN $\gamma$   | 98  |
| 2.4.2.3. IL-10  | 99  |
| 2.4.2.4. IL-4   | 100 |
| 2.4.3. Células CD8 <sup>+</sup> e CD8 <sup>-</sup>              | 101 |

|   |            |
|---|------------|
| 2.4.3.1. IL-12  | 101        |
| 2.4.3.2. IFN $\gamma$   | 102        |
| 2.4.3.3. IL-10  | 104        |
| 2.4.3.4. IL-4   | 105        |
| <b>3. Imunização de murganhos BALB/c com as fracções proteicas</b>  |            |
| <b>High e Low</b>   | <b>106</b> |
| 3.1. Densidade parasitária  | 106        |
| 3.2. Proliferação Linfocitária  | 106        |
| 3.2.1. Células CD4 <sup>+</sup> e CD4 <sup>-</sup>  | 106        |
| 3.2.2. Células CD8 <sup>+</sup> e CD8 <sup>-</sup>  | 107        |
| 3.3. Expressão de Citocinas   | 109        |
| 3.3.1. Células CD4 <sup>+</sup> e CD4 <sup>-</sup> de murganhos BALB/c imunizados com a fracção proteica High | 109        |
| 3.3.2. Células CD8 <sup>+</sup> e CD8 <sup>-</sup> de murganhos BALB/c imunizados com a fracção proteica High | 111        |
| 3.3.3. Células CD4 <sup>+</sup> e CD4 <sup>-</sup> de murganhos BALB/c imunizados com a fracção proteica Low  | 114        |
| 3.3.4. Células CD8 <sup>+</sup> e CD8 <sup>-</sup> de murganhos BALB/c imunizados com a fracção proteica Low  | 117        |
| 3.4. Produção de Citocinas  | 119        |
| 3.4.1. Células CD4 <sup>+</sup> e CD4 <sup>-</sup> de murganhos BALB/c imunizados com a fracção proteica High | 119        |
| 3.4.2. Células CD8 <sup>+</sup> e CD8 <sup>-</sup> de murganhos BALB/c imunizados com a fracção proteica High | 122        |
| 3.4.3. Células CD4 <sup>+</sup> e CD4 <sup>-</sup> de murganhos BALB/c imunizados com a fracção proteica Low  | 125        |
| 3.4.4. Células CD8 <sup>+</sup> e CD8 <sup>-</sup> de murganhos BALB/c imunizados com a fracção proteica Low  | 127        |
| <b>CAPÍTULO IV. DISCUSSÃO</b>   | <b>132</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>   | <b>150</b> |

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Gabriela Santos-Gomes, pela honestidade, humildade e forma humana demonstradas, pelo bom conselho nos momentos difíceis, pelo estímulo e contribuição para a minha formação técnico-científica e para o meu crescimento como cientista e, principalmente, pela amizade, compreensão, paciência e carinho.

À minha comissão tutorial, Prof<sup>a</sup>. Filomena Exposto da Unidade de Doenças Sexualmente Transmissíveis do IHMT e Prof<sup>a</sup>. Silvana Belo, da Unidade de Helminologia do IHMT, o meu sincero apreço pela forma crítica e construtiva como acompanharam este trabalho.

Às Dr.<sup>a</sup> Cláudia Marques e Dr.<sup>a</sup> Olivia Rodrigues pela energia e boa disposição que sempre demonstraram em todas as actividades ligadas a este estudo e que contribuíram de uma forma decisiva para a concretização dos objectivos propostos, para além da amizade que com o tempo cresceu.

À Prof<sup>a</sup>. Lenea Campino, Directora da Unidade de Leishmanioses.

Aos funcionários do IHMT que sempre demonstraram interesse e simpatia por mim.

Ao Prof. Virgílio do Rosário, Coordenador Científico do Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais do IHMT, e aos restantes membros do Centro, pelo apoio logístico e pela troca de experiências.

Aos actuais membros da Unidade de Leishmanioses pela sua disponibilidade e amizade.

Aos meus colegas e amigos Nuno Rolão, Sofia Cortes, Clara Leandro, Sandra Pereira e Maria José Capela pela participação directa ou indirecta que tiveram na realização

deste trabalho, por todos os momentos que partilhámos e pela amizade que a todos nos une.

A todos os meus amigos que me aturaram ao longo destes anos e que me incentivaram e contribuíram para que nunca desistisse.

À minha Mãe, sem ela nada teria sido possível, nem curso, nem investigação, nem tese, nem vida. Por todo o apoio, compreensão e amor demonstrados, e por tudo o resto que por palavras não se consegue expressar e que apenas alguns o podem sentir.

## SUMÁRIO

A Leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) causada por *Leishmania infantum* é um problema veterinário e de saúde pública na Bacia do Mediterrâneo, na América Central e do Sul e no Médio Oriente, sendo os canídeos o reservatório desta infecção.

As macromoléculas antigénicas libertadas por microrganismos são factores importantes no estabelecimento das interacções imunológicas e fisiológicas com o hospedeiro. De igual modo os produtos libertados por *Leishmania* sp. têm sido implicados em diferentes estadios do ciclo de vida do parasita quer no vector, quer no hospedeiro vertebrado.

Neste estudo foi analisada a capacidade das proteínas libertadas por promastigotas de *L. infantum* modelarem o tipo de resposta imunológica celular apresentado por duas estirpes de murganhos (BALB/c e C57BL/6) com diferentes graus de resistência à infecção por *Leishmania*, comparando a proliferação linfocitária, e a expressão e produção de citocinas do tipo Th1 (IFN $\gamma$ ), Th2 (IL-4), anti-inflamatória (IL-10) e pró-inflamatória (IL-12).

A estirpe de murganhos BALB/c mostrou-se mais sensível à infecção por *L. infantum*, demonstrando densidade parasitária crescente com níveis de proliferação inferiores aos apresentados pelos animais saudáveis, sugerindo imunossupressão. Os murganhos C57BL/6 evidenciaram restrição na multiplicação parasitária no decurso da infecção associada a níveis elevados de proliferação linfocitária. Nestes animais, as fracções proteicas induziram aumentos superiores de linfoproliferação que o antígeno parasitário, evidenciando a maior capacidade de estimulação celular das proteínas libertadas pelos promastigotas virulentos de *L. infantum* comparativamente ao antígeno parasitário. Nos murganhos BALB/c, a fracção Inter induziu a libertação de IL-4, a fracção Low a produção de IL-12 e a fracção High a libertação simultânea de IL-12 e IL-4. Os resultados sugerem que as proteínas High, Inter e Low exercem efeitos antagónicos na imunomodulação linfocitária. A fracção Low pode contribuir para o controlo do parasitismo enquanto que a fracção Inter parece estimular a multiplicação do parasita, evitando a activação do macrófago.

Considerando que o desenvolvimento da leishmaniose visceral está dependente da estimulação das diferentes subpopulações de células T e das citocinas que consequentemente são produzidas foi analisado, no presente estudo, o efeito das fracções proteicas libertadas por *L. infantum* na activação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nas duas estirpes de murganhos. Tendo-se verificado que as fracções High e Low estimularam simultaneamente as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> a coordenar uma resposta do tipo Th1/Tc1 em duas estirpes de murganhos com diferentes características genéticas. No seu conjunto, os resultados obtidos no presente estudo conduziram à selecção das fracções High e Low para os ensaio de imunização, dado serem reconhecias pelos diferentes grupos celulares, induzindo a apresentação de respostas protectoras sem que simultaneamente causassem uma forte produção de citocinas Th2.

Os murganhos BALB/c imunizados com as fracções High ou Low e infectados com *L. infantum* revelaram diminuição da carga parasitária do baço, mais acentuada nos animais imunizados com a fracção Low. Observou-se também que a imunossupressão da proliferação linfocitária causada pela infecção por *L. infantum*, deixou de se verificar, apresentado os linfócitos esplénicos níveis consideráveis de linfoproliferação específica. A imunização com a fracção High, também contribuiu para o predomínio de uma resposta protectora ao nível das células T CD4<sup>+</sup>, com libertação de IL-12, quando especificamente estimuladas. Nos animais imunizados com a fracção Low a análise isolada das subpopulações linfocitárias revelou o predomínio da libertação de IL-12 e de IFN $\gamma$ . Adicionalmente, em ambas as imunizações, a activação celular foi acompanhada pela regulação negativa da produção de citocinas associadas à evolução da doença, como a IL-10 e IL-4.

Os resultados obtidos no presente estudo põem em evidencia o interesse da utilização das fracções High e Low na profilaxia da LVZ.

## SUMMARY

Zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL), caused by *Leishmania infantum*, is a veterinary and public health problem in the Mediterranean Basin, South and Central America and in the Middle East. Canids are the host reservoir for ZVL.

Antigenic macromolecules secreted by microorganisms are important in the establishment of immune and physiologic interactions with the host. *Leishmania* sp. released products have been implicated in different parasite life-cycle stages, either in the vector or in the vertebrate host.

In this study, the capacity of the proteins secreted by promastigotes of *L. infantum* to modulate the cellular immune response was analysed in two mice models (BALB/c and C57BL/6) with different degrees of resistance to infection. Lymphocyte proliferation, and the expression and production of cytokines from Th1 type (IFN $\gamma$ ), Th2 type (IL-4), anti-inflammatory (IL-10) and pro-inflammatory (IL-12) were compared.

BALB/c mice revealed to be more susceptible to *L. infantum* infection, showing increasing parasite density and lower proliferation levels when compared to healthy animals, suggesting mechanisms of immunosuppression.

In C57BL/6 mice a restriction in parasite replication during the course of infection was observed, associated with considerable proliferation levels. In these animals, the protein fractions induced higher proliferation levels than the parasite antigen, highlighting the greater capacity of cellular stimulation of the proteins secreted by virulent promastigotes of *L. infantum*.

In BALB/c mice, fraction Inter induced the release of IL-4, fraction Low the production of IL-12 and fraction High both IL-4 and IL-12. These results suggest that proteins High, Inter and Low have antagonistic effects in the lymphocyte immunomodulation. Fraction Low can contribute to parasite control while fraction Inter seems to stimulate parasite replication avoiding the macrophage activation.

Considering that visceral leishmaniasis development is dependent on the stimulation of different T cell populations and of consequently released cytokines, in the present study, the effect of the *L. infantum* secreted protein fractions in the activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was analysed in the two mice models. Fractions High and Low stimulated both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells to coordinate a Th1/Tc1 type of response in both mice



strains of different genetic backgrounds. Through the analysis of the results obtained in this study, fractions High and Low were selected for the immunisation assays since they were recognised by different cellular populations to induce protective responses without simultaneous production of Th2 cytokines.

BALB/c mice immunised with fraction High or Low and infected with *L. infantum* showed a decrease in the spleen parasite burden which was more evident in the Low fraction immunised animals. It was also verified that immune suppression caused by *L. infantum* was no longer observed and that splenic lymphocytes presented considerable levels of antigen specific proliferation. The immunisation with fraction High also contributed to the predominance of a protective response in CD4<sup>+</sup> T cells with production of IL-12 and IFN- $\gamma$ . Furthermore, in both immunisation assays the cellular activation was accompanied by negative regulation of the production of cytokines associated to disease development, such as IL-10 and IL-4.

The results obtained in the present study highlights the application of fractions High and Low in the ZVL prophylaxis.

## OBJECTIVO

O conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na resistência/sensibilidade à infecção por *Leishmania* são fundamentais para o desenvolvimento de uma vacina.

Como tal propôs-se como objectivo geral para este estudo analisar o tipo de resposta imunológica celular induzida por produtos libertados por *L. infantum*, ao nível:

- da indução de proliferação linfocitária;
- do padrão de citocinas expressas e produzidas por linfócitos;
- da activação dos linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>;
- da protecção em murganhos.

## ABREVIATURAS

A – absorvância

Ag – Antígeno solúvel de *L. infantum*

APCs - “antigen presenting cells” ou células apresentadoras de antígenos

APS – persulfato de amônia

BCG - Bacilo de Calmette-Guérin

BSA - “bovine serum albumine” ou albumina sérica bovina

C;G;A;T - citosina; guanina; adenina; timina

CD - “cluster of differentiation”

cDNA - ácido desoxiribonucleico complementar

Ct - “cycle threshold”

DAT - “direct agglutination test” ou teste de aglutinação directa

DEPC - dietilpirocarbonato

DNA - ácido desoxiribonucleico

DNase - Desoxiribonuclease

dNTPs – 3’-desoxinucleotídeo trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP )

EDTA - ácido acético tetra- etilenodiamino

ELISA - “enzyme-linked immunosorbent assay”

FCS - “fetal calf serum” ou soro bovino fetal

FML – ligando da fucose-manose

g - grama

g - força gravitacional

GIPLs - glicoinositolfosfolípidos

GITC – guanidina isotiocianato

gp - glicoproteína

HCl – ácido clorídrico

HIV – “Human Immunodeficiency Virus” ou Virus da Imunodeficiência Humana

H<sub>2</sub>O - água

HPRT - “hypoxanthine-guanine phosphoribozyl transferase”

IFN-γ - interferon gama

IgG - imunoglobulina G

IL - interleucina

IL-12 (p70) - glicoproteína heterodímera de 70 kDa que é a forma biologicamente activa da IL-12

iNOS - “inducible nitric oxide synthase” ou sintetase induzida do óxido nítrico  
kDa - kiloDalton

LACK - “*Leishmania* receptor for activated C kinase”

LC - leishmaniose cutânea

LCa - leishmaniose canina

LMC - leishmaniose mucocutânea

LPG - “lipophosphoglycan” ou lipofosfoglicano

LV - leishmaniose visceral

LVZ – leishmaniose visceral zoonótica

M; mM;  $\mu$ M - molar; milimolar; micromolar

mA - miliamperes

mg;  $\mu$ g - miligrama; micrograma

MHC - “major histocompatibility complex” ou complexo maior de histocompatibilidade

MHC I - da classe I do MHC

MHC II - da classe II do MHC

ml;  $\mu$ l - mililitro; microlitro

M-MLVRT – “Moloney murine leukemia vírus reverse transcriptase”

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

NaCl – cloreto de sódio

NK - “natural killer”

nm - nanometro

NNN - “Novy, Nicolle, MacNeal”

NO - “nitric oxide” ou óxido nítrico

°C - graus Celsius

PAGE - “polyacrilamid gel electrophoresis” ou electroforese em gel de poliacrilamida

Pb - pares de bases

PBS - “phosphate buffer saline” ou tampão fosfato salino

PCR - “polymerase chain reaction” ou reacção em cadeia da polimerase

pH - potência em iões hidrogénio

pi - pós-infecção

RA – Região do Algarve

RAD – Região do Alto Douro

RFLP – Polimorfismos de dimensão de fragmentos de restrição

RML – Região Metropolitana de Lisboa

RNA – ácido ribonucleico

RNase - ribonuclease

RPMI - “Roswell Park Memorial Institut”

RT - “reverse transcription” ou transcrição reversa

s/ - sem

SDS - “sodium dodecyl sulphat” ou dodecil sulfato de sódio

TGF- $\beta$  - “transforming growth factor” beta ou factor transformador de crescimento beta

Th - T “helper”

TMB - tetrametilbenzidina

TNF- $\alpha$  - “tumor necrosis factor” alfa ou factor de necrose tumoral alfa

Tr – Células T reguladoras

Tris - hidroximetilamonimetano

U – unidades

V - volt

v/v; p/v - volume/volume; peso/volume

WHO - “Worth Health Organization” ou Organização Mundial de Saúde

# **CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO**

# CAPÍTULO I

## 1. Epidemiologia das Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças com manifestações clínicas distintas, causadas por várias espécies do género *Leishmania* Ross, 1903 e transmitidas através de insectos voadores, dos géneros *Phlebotomus* Rondani, 1843 e *Lutzomyia* França, 1924. Têm uma ampla distribuição geográfica por todos os continentes, com a excepção da Antárctida e da Austrália (Ashford *et al*, 1992, Dedet, 1993, WHO, 2002). Estima-se que anualmente cerca de dois milhões de indivíduos de 88 países, dos quais 72 em via de desenvolvimento sejam afectados pela doença (Desjeux, 1999, WHO, 2002). As leishmanioses humanas são parasitoses importantes quer em termos de morbilidade quer em termos de mortalidade. Se não forem diagnosticadas a tempo e se o tratamento adequado não for administrado, as formas mais graves da infecção podem levar à morte. Devido a um conjunto de circunstâncias, tais como: 1) a notificação não ser obrigatória em muitos dos países onde a doença é endémica; 2) de a maior parte dos dados oficiais ser obtida exclusivamente através de detecção passiva; 3) de a infecção ser apenas detectada em casos com sintomatologia; 4) de muitos doentes não terem acesso a assistência médica ou a meios de diagnóstico adequados, os números oficiais disponíveis parecem subestimar o número de casos reais (Desjeux, 1996; Campino, 1998).

Dependendo da espécie de *Leishmania* infectante e do estado imunológico do hospedeiro, as leishmanioses podem manifestar-se clinicamente sob a forma cutânea, mucocutânea ou visceral (Gramiccia *et al*, 1992; Pearson & Sousa, 1996). Na Índia, Bangladesh, Sudão e Brasil, ocorrem mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral enquanto que a maioria dos casos de leishmaniose cutânea se encontra no Médio Oriente (Velho Mundo) e no Brasil e Perú (Novo Mundo).

Durante muitos anos foi atribuída pouca importância às leishmanioses devido à falta de conhecimento do seu impacto na saúde pública. Em 1992, mais de metade dos casos de leishmaniose visceral (ou kala-azar) ocorriam apenas em dois países: Índia e Sudão e mais de metade dos casos de leishmaniose cutânea (LC) observavam-se no Afeganistão, no Irão, no Iraque, na Arábia Saudita, na Síria, na Argélia, no Sudão e no Brasil (Ashford *et al*, 1992). Nos últimos anos, o número de regiões endémicas tem aumentado, verificando-se um grande incremento do número de casos descritos. Nas décadas de 80 e 90 ocorreram epidemias de leishmaniose visceral (LV) com elevada mortalidade, em várias regiões. No Bangladesh registaram-se 2300 casos em 1988, tendo-se elevado para 15000 em 1995. A região oeste da Índia foi sujeita a uma grave epidemia de kala-azar em 1993, suspeitando-se que 200 mil a 250 mil indivíduos tenham contraído a doença, um valor cinco vezes superior ao número de casos notificados (Dejeux, 1996). No final de 1997 e início de 1998, a LV assumiu proporções epidémicas na Etiópia e no Sudão, apesar desta doença ser endémica há muitos anos nestes países. Na região leste do Sudão, foram registados 2500 casos de LV entre Outubro e Dezembro de 1997, enquanto que nos nove meses anteriores tinham ocorrido 1900 casos (McGregor, 1998). O número de casos de LV variou de 3110 a 3817 entre 1991 e 1996, logo depois da primeira guerra do golfo, tendo diminuído para 744 até 1999. Em 2000 e 2001, o número de indivíduos com LV aumentou para 2611 e 2893, respectivamente. No Nordeste brasileiro, o número de casos subiu de 2000 em 1989, para 9000 em 1993 (Dejeux, 1996). A LC tem, igualmente, aumentado em vários países como na Tunísia, com 1300 casos registados em 1983 e mais de 6000 casos por ano desde 1990; na Turquia, onde de 550 casos em 1990, se passou para 4000 em 1994; e na Síria onde foram descritos 1650 casos em 1987 aumentando para 10 mil em 1993 e para 16 mil em 1995. Na primeira metade da década de 90, o número de casos de LC no Iraque variou entre 6662 e 8779, tendo ocorrido uma diminuição para 625 casos em 2001. Também na



Argélia o número de casos aumentou consideravelmente nas décadas de 80 e 90, tanto de LV com 1121 casos, como de LC com mais de 2000 casos por ano (Harrat *et al*, 1996).

A expansão das leishmanioses ao nível mundial está associada a várias alterações epidemiológicas como o crescimento desmesurado de centros urbanos com carências graves ao nível do saneamento básico e, as migrações em massa que promovem o contacto dos vectores com indivíduos provenientes de regiões não endémicas. Também se encontra relacionada com outros factores de desenvolvimento ambiental e económico, como a destruição das grandes manchas verdes do planeta e construção de diques que favorecem a proliferação do vector, a deslocação dos reservatórios para junto das populações humanas onde existem fontes de alimentação e abrigos disponíveis, enquanto que a redução das campanhas de controlo da malária levaram à emergência de leishmanioses em diversos países (Dejeux, 1996). Por outro lado, os factores que afectam a sobrevivência e o comportamento dos hospedeiros de *Leishmania* sp., podem interferir no ciclo de transmissão do parasita.

Um hospedeiro vertebrado pode ser classificado como reservatório se for a fonte da infecção humana (Deane, 1956) e se permitir que o parasita se multiplique indefinidamente (Ashford & Bettini, 1987), pelo que, para cada espécie de *Leishmania* existe um ou um número reduzido de reservatórios.

Os reservatórios propriamente ditos podem distinguir-se em primários (ou naturais) e secundários, estando os reservatórios primários associados a focos primitivos e a animais silváticos e os reservatórios secundários relacionados com a acção do Homem, que entrou no ciclo natural levando à substituição dos hospedeiros naturais por reservatórios domésticos como é o caso do cão (Hoare, 1962; Garnham, 1965). O equilíbrio existente entre o reservatório primário e o parasita dá origem a infecções assintomáticas ou oligossintomáticas, com uma evolução longa e que permitem ao parasita completar o seu ciclo de vida. Os reservatórios secundários em regra apresentam doença por imperfeita relação entre hospedeiro e parasita (Garnham, 1965; Abranches, 1986).

São hospedeiros acidentais, outros vertebrados infectados que podem por vezes ser fonte da infecção humana, mas que ao longo do tempo não contribuem para a sobrevivência do parasita e que não desempenham um papel importante na

epidemiologia das leishmanioses (Rioux *et al*, 1969; Abranches, 1986; Ashford & Bettini, 1987; Abranches, 1989). Alguns casos de hospedeiros acidentais são os achados de gatos infectados na Argélia, Brasil, Portugal e Itália (Sergent *et al*, 1912; Chagas *et al*, 1938; Durão *et al*, 1994; Pennisi *et al*, 1998), de um urso no Curdistão (citado por Garnham, 1965), um cavalo no Uganda e recentemente outro na Alemanha (Richardson, 1926; Koehler *et al*, 2002), um porco-espinho no Turquistão (WHO, 1980) e um guaxinim na China (Zhi Biao *et al*, 1984).

### 1.1 Leishmaniose cutânea e mucocutânea

A LC é provocada por várias espécies que originam formas clínicas diversas que vão desde lesões benignas simples ou múltiplas, a lesões difusas de difícil cura ou mesmo incuráveis. Esta parasitose pode levar à formação de cicatrizes profundas ou mesmo trazer complicações de certa gravidade. As espécies de *Leishmania* causadoras de LC são, na sua maioria, zoonoses silváticas que têm como reservatórios numerosos animais, sendo a maior parte roedores, mas também marsupiais e desdentados (Abranches, 1986). A distribuição geográfica da LC abrange o Velho Mundo e o Novo Mundo (Tabela 1) apresentando diferenças quer nas variantes clínicas, quer nos reservatórios e espécies infectantes.

No Velho Mundo, *L. major* Yakimoff e Schokhor, 1914 é responsável pela maioria dos casos de LC zoonótica. Os indivíduos infectados apresentam, normalmente, lesões nos membros, podendo ulcerar profundamente deixando cicatrizes desfigurantes em casos mais graves, sobretudo quando ocorrem surtos epidémicos (Desjeux, 1996). É endémica nos vales secos semidesérticos do Norte de África, do Médio Oriente e da Península Arábica, da Índia ao Kasaquistão e ainda da África Ocidental-subsariana até ao Sudão e Norte do Quênia e Etiópia (Bryceson, 1996). A Norte do Sara os reservatórios são principalmente roedores, particularmente gerbilos *Rhombomys opimus* Lichtenstein, 1823. *Ph. papatasi* Scopoli, 1786 é o vector mais importante, possui maior actividade ao amanhecer e ao anoitecer e vive em tocas de gerbilos e habitações humanas. *Ph. sergenti* Parrot, 1917 tem um papel secundário, apesar da sua grande dispersão. A Sul do Sara a infecção tem menor prevalência e o vector é *Ph. duboscqui* Neveu e Lemaire, 1906 que vive em tocas de roedores (Bryceson, 1996).

*L. tropica* Wright, 1903 é o agente da LC antroponótica, sendo a transmissão principalmente urbana. Esta espécie de *Leishmania* atinge preferencialmente crianças e as lesões são encontradas quase sempre na face. A sua distribuição vai desde a Grécia até ao Norte da Sérvia e Roménia, abrangendo a Turquia, o Médio Oriente, o Oeste da Ásia até ao Afeganistão, a Índia e todo o litoral do Norte de África. O Homem é o principal e possivelmente o único reservatório. O vector mais importante é *Ph. sergenti*, que existe em abundância nas cidades e vilas. Pica dentro e fora das habitações, atingindo o máximo populacional durante o Verão. *Ph. papatasi* também transmite esta espécie no Norte de África e Médio Oriente (Bryceson, 1996).

*L. aethiopica* Ashford e Bray, 1973 pode provocar uma forma difusa da LC em indivíduos que não respondem imunologicamente à infecção, com as lesões a atingirem as margens mucocutâneas e persistindo durante muitos anos (Berhe *et al*, 1995). Existe na Etiópia, no Oeste do Quénia e no Leste do Uganda, em altitudes entre os 1500 e os 2700 m (Bryceson, 1996). O reservatório zoonótico é o roedor hirax. Na Etiópia e Uganda, os vectores *Ph. longipes* Parrot e Martin, 1939 e *Ph. pedifer* Lewis, Mutinga e Ashford, 1972 vivem nas tocas do hirax, picando-o facilmente, bem como o gado e o Homem. No Quénia encontra-se apenas *Ph. pedifer* que apresenta maior actividade nas tardes quentes e húmidas e ao ar livre (Lainson & Shaw, 1987).

Recentemente, foram descritas lesões cutâneas, que normalmente aparecem na face e que tendem a evoluir para cura, causadas pelos zimodemos dermatrópicos MON-24 e MON-29 de *L. infantum* Nicolle, 1908. Estes zimodemos têm sido identificados no Sul da Europa e no Norte de África (Belazzoug *et al*, 1985; Jiménez *et al*, 1991; Marty *et al*, 1994; Pratlong *et al*, 1995), não tendo ainda sido possível definir claramente os seus reservatórios.

No Novo Mundo, pelo menos seis espécies de *Leishmania* causam LC. Com excepção de *L. peruviana* Velez, 1913, as suas distribuições geográficas e a grande diversidade de vectores e reservatórios, tornam difícil a distinção dos diferentes ciclos epidemiológicos.

*L. mexicana* Biag, 1953, apresenta na Península do Iucatão no México elevadas prevalências, mas estende-se ao longo da Guatemala e das Honduras e, do Panamá até à Colômbia. Esta espécie causa lesões na face ou na região posterior do pavilhão

auricular que curam em seis a oito meses. No entanto, se o pavilhão auricular é atingido a infecção pode tornar-se crônica, provocando a destruição da cartilagem. Numerosos roedores que habitam a floresta servem de reservatórios, sendo o único vector conhecido *Lu. olmeca olmeca* Vargas e Diaz-Najera, 1959 que pica o Homem quando este invade o seu habitat (Lainson & Shaw, 1987).

*L. amazonensis* Lainson & Shaw, 1979, existe na floresta amazônica do Brasil, na Venezuela, na Colômbia, no Equador, no Peru e na Bolívia (Bryceson, 1996). Atinge uma grande variedade de roedores e marsupiais da floresta, e a infecção é inaparente, sendo os parasitas encontrados na pele sã (Dedet, 1993). Este parasita causa uma forma difusa de LC no Novo Mundo, é rara e atinge principalmente indivíduos com algum tipo de imunodeficiência. Não manifesta tendência para a cura espontânea e apresenta resistência à terapêutica anti-leishmania. O único vector conhecido, *Lu. flaviscutella* Mangabeira, 1942 está amplamente disperso mas não é antropofílico.

*L. braziliensis* Vianna, 1911 é responsável por grande parte dos casos de LC na América Central e do Sul. É endêmica nas florestas quentes e húmidas, mas está a adaptar-se aos meios suburbanos. Encontra-se na Guatemala, nas Honduras, na Costa Rica, no Panamá, na Colômbia, na Venezuela, no Peru, na Bolívia, no Brasil, no Paraguai e na Argentina. Os reservatórios da floresta não foram identificados, mas na sua localização suburbana, os reservatórios são provavelmente os cães e os equinos (Bryceson, 1996). Provoca também a forma clínica mais grave, a leishmaniose mucocutânea (LMC). A LMC ou “espúndia” é caracterizada pelo aparecimento de uma lesão cutânea que pode secundariamente formar metástases, afectando as mucosas faciais e originando mutilações faciais graves (Dedet, 1993). O vector melhor estudado é *Lu. wellcomei* Fraiha, Shaw e Lainson, 1971.

*L. peruviana* Velez, 1913 apesar de ser indistinta de *L. braziliensis* por técnicas de identificação isoenzimáticas, tem sido reconhecida como uma espécie diferente. Existe nos vales dos Andes do Peru e nas terras altas da Argentina (Lainson & Shaw, 1987). O cão é considerado o reservatório desta espécie, suspeitando-se também que roedores possam ter um papel importante como hospedeiros. Normalmente provoca lesões na face em crianças, podendo atingir os bordos mucocutâneos quando a úlcera primária se situa no nariz ou nos lábios. Os vectores são *Lu. peruensis* Shanon, 1929 e *Lu. verrucarum* Townsend, 1913.

*L. panamiensis* Lainson & Shaw, 1972 é muito frequente na América Central, encontrando-se nas Honduras, na Nicarágua, na Costa Rica, no Panamá e na Costa do Pacífico até ao Equador. O seu reservatório natural é a preguiça *Choleopus hoffmani* Peters, 1859 que vive na floresta. As infecções humanas e caninas são essencialmente acidentais (Bryceson, 1996), no entanto, esta espécie tem também sido responsabilizada por alguns casos de LMC (Dedet, 1994). Os vectores principais são *Lu. trapedoi* Fairchild e Hertig, 1952 e *Lu. ylephiletor* Fairchild e Hertig, 1952.

*L. guyanensis* Floch, 1954 está restrita à floresta amazónica do Brasil, das Guianas, do Suriname e da Colômbia. Os hospedeiros naturais são as preguiças arborícolas *Choleopus didactylus* L., 1758 e o papa-formigas *Tamandra tetradactyla* L., 1758 (Bryceson, 1996). *L. guyanensis* provoca, em muitos casos, lesões múltiplas no tronco ou nos membros, podendo ainda haver envolvimento dos vasos linfáticos, com disseminação da infecção por via linfática (Dedet, 1990). Neste caso as lesões podem persistir por muitos anos. O vector principal é *Lu. umbratilis* Ward e Fraiha, 1977. Foram ainda encontradas naturalmente infectadas as espécies *Lu. whitmani* Antunez e Coutinho, 1939 e *Lu. anduzei* Roseboom, 1942 (Dedet, 1993).

Outras espécies recentemente descritas como *L. lainsoni* Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa, 1987 e *L. naiffi* Lainson & Shaw, 1989, têm sido encontradas, no Brasil, Perú e Bolívia, em casos humanos de LC e causam geralmente uma única lesão cutânea, podendo também ocorrer metástases (Dedet, 1993). *L. lainsoni*, tem como vector *Lu. ubiquitalis* e como reservatório um roedor. Tendo como hospedeiro natural o desdentado, *L. naiffi* é transmitida por *Lu. ayrozai* Barretto & Coutinho 1940 e *Lu. paraensis* Costa Lima, 1932.

**Tabela 1.** Síntese da distribuição geográfica da leishmaniose cutânea, das espécies infectantes, e dos respectivos vectores e reservatórios (Dedet, 1993; Marselha & Gopegui, 1998; Dedet, 2000; Killick-Kendrick, 2002).

|                    | Distribuição geográfica   | Espécie                | Vectores   | Reservatórios         |
|--------------------|---|------------------------|--|-----------------------|
| <b>Velho Mundo</b> | Médio Oriente, Ásia Central, Índia, N. África e Sudão             | <i>L. major</i>        | <i>Ph. papatasi</i><br><i>Ph. sergenti</i><br><i>Ph. salehi</i><br><i>Ph. caucasicus</i><br><i>Ph. ansarii</i><br><i>Ph. duboscqui</i> | Roedores              |
|                    | Médio Oriente, N. África, Região Mediterrânica, Índia e Paquistão | <i>L. tropica</i>      | <i>Ph. sergenti</i><br><i>Ph. papatasi</i>   | Homem                 |
|                    | Quênia  |                        | <i>Ph. aculeatus</i>   |                       |
|                    | Etiópia, e Uganda<br>Quênia                                       | <i>L. aethiopica</i>   | <i>Ph. longipes</i><br><i>Ph. pedifer</i>  | Roedores              |
|                    | Região Mediterrânica  | <i>L. infantum</i>     | <i>Ph. ariasi</i><br><i>Ph. perniciosus</i>  | Desconhecido          |
| <b>Novo Mundo</b>  | América Central e Sul   | <i>L. mexicana</i>     | <i>Lu. olmeca olmeca</i><br><i>Lu. ayacuchensis</i><br><i>Lu. ylephiletor</i>  | Roedores              |
|                    | América Central e Sul   | <i>L. amazonensis</i>  | <i>Lu. flavisculleta</i><br><i>Lu. olmeca</i>  | Roedores, Marsupiais  |
|                    | América Central e Sul (LC / LMC)                                  | <i>L. braziliensis</i> | <i>Lu. wellcomei</i><br><i>Lu. whitmani</i><br><i>Lu. ovallesi</i><br><i>Lu. carrerae carrerae</i>                                     | Cão, Cavalo           |
|                    | América do Sul  | <i>L. peruviana</i>    | <i>Lu. peruensis</i><br><i>Lu. verrucarum</i>  | Cão, Roedores         |
|                    | América Central e Sul (LC / LMC)                                  | <i>L. panamensis</i>   | <i>Lu. trapidoi</i><br><i>Lu. ylephiletor</i><br><i>Lu. gomezi</i><br><i>Lu. panamensis</i>  | Preguiças             |
|                    | América do Sul  | <i>L. guyanensis</i>   | <i>Lu. umbratilis</i><br><i>Lu. anduzei</i><br><i>Lu. whitmani</i>   | Preguiças, Marsupiais |
|                    | Brasil, Perú e Bolívia  | <i>L. lainsoni</i>     | <i>Lu. ubiquitalis</i>   | Roedor                |
|                    | Brasil, Perú e Bolívia  | <i>L. naiffi</i>       | <i>Lu. ayrozai</i><br><i>Lu. paraensis</i>   | Desdentado            |
|                    |   |                        |  |                       |

*L.* – *Leishmania*; *Ph.* – *Phlebotomus*; *Lu.* – *Lutzomyia*;

## 1.2 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral ou kala-azar é uma infecção que afecta particularmente os órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocítico (baço, fígado, medula óssea e gânglios linfáticos). A doença pode ser fatal se não for tratada e os principais sintomas são febre, hepatoesplenomegalia e hiperproteinemia. Tem uma vasta distribuição geográfica desde a China, passando pelo subcontinente Indiano, por vários países do sul da Europa, Norte de África, África Oriental e América do Sul.

Apesar de poder desencadear epidemias graves, como as que ocorreram na Índia e na província de Haut-Xil no Sudão, a LV é endémica na maior parte dos focos existentes (De Beer *et al*, 1990).

*L. infantum* é responsável pela LV zoonótica (LVZ) que ocorre na bacia do Mediterrâneo, na Ásia Central, no Sudoeste e Noroeste da China e no Norte de África (Lainson & Shaw, 1987). A LVZ tem como reservatório o cão, *Canis familiaris*, L., 1758, mas vários canídeos selvagens como o chacal *Canis aureus* L., 1758 e o lobo *Canis lupus* L., 1758 podem ser responsáveis por ciclos silváticos (Latyshev *et al*, 1951; Petrisceva, 1961; Lubova, 1973). No sul da Europa, foram também identificados parasitas em raposas *Vulpes vulpes* L., 1758 (Bettini *et al*, 1980; Abranches *et al*, 1984). Alguns roedores parasitados com *L. infantum* foram ainda encontrados em Itália (Bettini *et al*, 1980; Pozio *et al*, 1981), o que sugere um possível papel destes animais em termos epidemiológicos e coloca a hipótese de estes serem os reservatórios primários da LVZ (Tabela 2).

A transmissão é feita sobretudo através dos vectores *Ph. perniciosus* Newstead, 1911 e *Ph. ariasi* Tonnoir, 1921 que existem na região mediterrânea. Outros vectores são *Ph. perfiliewi*, *Ph. tobbi*, *Ph. neglectus*. *Ph. langeroni* existe na África Oriental, *Ph. kandelaki* no Médio Oriente e *Ph. longiductus* na Ásia Central (Dedet, 1993; 2000, Marselha & Gopegui, 1998; Killick-Kendrick, 2002). Na China, o vector de *L. infantum* é *Ph. chinensis* Newstead, 1916 (Bryceson, 1996).

*L. chagasi* Cunha e Vargas, 1937 é responsável pela LV no Novo Mundo que apresenta prevalências elevadas no Nordeste do Brasil e na Venezuela e tem como reservatórios vários canídeos (Tabela 2). Esta espécie tem sido considerada por muitos autores como idêntica a *L. infantum* e terá sido introduzida no continente americano pelos colonizadores espanhóis e portugueses, por intermédio dos seus

cães, que mesmo parasitados sobreviviam às longas viagens (Dedet, 1993). Vários trabalhos que compararam perfis enzimáticos de mais de 100 isolados de *L. chagasi* com *L. infantum* (Moreno *et al*, 1986; Momen *et al*, 1987) e ainda estudos de caracterização genética por Maurício *et al*. (1999) apoiam a teoria de que são a mesma espécie. A transmissão é rural e peridoméstica, através do vector *Lu. longipalpis* Lutz e Neiva, 1912.

**Tabela 2.** Síntese da distribuição geográfica da leishmaniose visceral, espécies infectantes, respectivos vectores e reservatórios (Dedet, 1993; Marselha & Gopegui, 1998; Dedet, 2000; Killick-Kendrick, 2002).

|                    | Distribuição geográfica                                   | Espécie            | Vectores   | Reservatórios      |
|--------------------|---|--------------------|--|--------------------|
| <b>Velho Mundo</b> | Região Mediterrânea                                       | <i>L. infantum</i> | <i>Ph. ariasi</i><br><i>Ph. perniciosus</i><br><i>Ph. perfiliewi</i><br><i>Ph. tobbi</i><br><i>Ph. neglectus</i><br><i>Ph. langeroni</i><br><i>Ph. kandelaki</i><br><i>Ph. longiductus</i><br><i>Ph. chinensis</i> | Canídeos           |
|                    | África Oriental<br>Médio Oriente<br>Ásia Central<br>China |                    |  |                    |
|                    | Quênia, Etiópia, Sudão                                    | <i>L. donovani</i> | <i>Ph. martini</i><br><i>Ph. orientalis</i><br><i>Ph. celiae</i><br><i>Ph. argentipes</i><br><i>Ph. alexandri</i>  | Homem,<br>Roedores |
|                    | Índia, Paquistão<br>China                                 |                    |  | Homem              |
| <b>Novo Mundo</b>  | América Central e Sul                                     | <i>L. chagasi</i>  | <i>Lu. longipalpis</i><br><i>Lu. evansi</i>  | Canídeos           |

*L.* – *Leishmania*; *Ph.* – *Phlebotomus*; *Lu.* – *Lutzomyia*;

*L. donovani* Laveran e Mesnil, 1903 causa LV antroponótica no subcontinente indiano, no Norte e Oeste da China, na África Oriental e na África subsariana, em especial no Sul do Sudão, na Somália e no Norte do Quênia (Lainson & Shaw, 1987). O Homem é o único reservatório conhecido. O parasita circula no sangue do hospedeiro e pode acontecer que depois do tratamento e de se ter atingido a cura clínica, o parasita se mantenha limitado aos tecidos cutâneos dando origem à forma de leishmaniose dérmica pós kala-azar, que contribui para a manutenção deste ciclo



antroponótico (Bryceson, 1996). *Ph. argentipes* Annandale e Brunetti, 1908 é o vector na Índia. No Sudão *Ph. orientalis* Parrot, 1936 transmite a infecção a alguns roedores, para além do Homem que tem o principal papel como reservatório, enquanto que no Quênia *Ph. martini* Parrot, 1936 foi encontrado infectado e é capaz de transmitir a infecção (Tabela 2).

### 1.3 Leishmaniose visceral na Bacia Mediterrânea

A maioria dos casos de leishmaniose visceral humana nos países da bacia mediterrânea é provocada por *L. infantum* zimodemo MON<sup>1</sup>-1. Apesar de ser uma doença que atingia principalmente as crianças, a partir da década de 80, em países como França, Itália e Portugal, o número de adultos infectados tornou-se igual ou superior (Quilici *et al*, 1987; Marty *et al*, 1994; Santos-Gomes *et al*, 1998). Esta alteração epidemiológica deveu-se, sobretudo ao aumento de indivíduos imunocomprometidos, devido, em grande parte à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Casos de LV provocados por zimodemos considerados dermatrópicos, como, por exemplo, *L. infantum* MON-29 e MON-24, bem como uma grande diversidade de zimodemos, habitualmente não causadores de doença em indivíduos imunocompetentes, têm sido observados em doentes imunocomprometidos (Jiménez *et al*, 1991; Dereure *et al*, 1995; Campino *et al*, 1994a; Santos-Gomes *et al*, 1998).

Uma vez que é frequente o contacto de flebótomos zoo-antropofílicos com o cão, que por sua vez co-habita com o Homem, também a leishmaniose canina (Lca) é endémica nesta região. No cão observam-se elevadas taxas de infecção, no entanto como a doença apresenta uma evolução crónica, a infecção pode persistir de uma época de transmissão para a seguinte, em áreas endémicas onde a transmissão não é contínua (Abranches *et al*, 1998). O primeiro caso de Lca, na região mediterrânea foi descrito na Tunísia em 1908 por Nicolle & Comte. À medida que os estudos foram avançando, verificou-se que a infecção apresenta, em alguns locais, uma elevada prevalência, como na Sicília, onde cerca de 40% dos cães se encontram

---

<sup>1</sup> MON é a abreviatura de Montpellier, Universidade de Montpellier, que integra o “Laboratoire d’Ecologie Médicale et Pathologie Parasitaire”, onde foi desenvolvida a técnica de tipagem isoenzimática aplicada a *Leishmania*

parasitados (Mansueto *et al*, 1982). Apesar de a relação directa entre o papel dos cães infectados e a LV Humana ser controversa (Bettini *et al*, 1980), a LCa é um problema veterinário e de saúde pública muito grave. Na realidade, a infecção no cão apresenta valores muito superiores e estende-se por uma área muito mais vasta que a humana (Houin *et al*, 1977). Devido a uma elevada proporção de cães infectados assintomáticos e porque o diagnóstico parasitológico, por exame directo ou através da reacção em cadeia da polimerase (PCR), não é suficientemente sensível ou de fácil aplicação, a detecção de anticorpos específicos continua a ser o método de diagnóstico de eleição na avaliação da prevalência e nos estudos epidemiológicos (Gradoni, 1999; Zaffaroni *et al*, 1999; Quinnell *et al*, 2001; Reithinger *et al*, 2002; França-Silva *et al*, 2003). Um título serológico positivo não implica necessariamente que o animal desenvolva LCa, no entanto uma elevada correlação positiva entre uma resposta serológica e a infectividade para com o vector tem sido observada, tanto em cães sintomáticos como assintomáticos (Molina *et al*, 1994). Daqui se deduz que é necessário detectar o mais cedo possível a infecção canina por *Leishmania* de maneira que se reduza a infectividade, quer através do tratamento ou da eliminação dos cães portadores de parasitas (Palatnik-de-Sousa *et al*, 2001). No entanto, esta medida extrema deverá ser evitada por razões éticas e sociais. Vacinas eficazes serão a solução para prevenir a infecção canina e humana, que numa perspectiva epidemiológica deverão também impedir a transmissão do parasita (Cardoso *et al*, 2004).

Para além do cão, outros canídeos selvagens contribuem para a transmissão de *Leishmania* através de um ciclo silvático autónomo ou semi-autónomo, como, por exemplo, a raposa que tem sido encontrada parasitada no Sul de França, Itália, Espanha e Portugal (Rioux *et al*, 1968; Bettini *et al*, 1980; Iniesta *et al*, 1982; Abranches *et al*, 1984).

#### **1.4 Leishmaniose em Portugal**

Em Portugal, o primeiro caso de leishmaniose visceral foi descrito em 1910, por Dyonisio Alvares, numa criança de nove anos de idade, residente em Lisboa. No ano

seguinte, foi efectuado um inquérito em 300 cães da região de Lisboa, dos quais oito se encontravam infectados por *Leishmania* (Alvares & Silva, 1911).

Os estudos realizados por Carlos França, de 1912 até 1919, com *Ph. papatasi* revelaram a importância médica dos flebótomos na transmissão de arbovírus (França, 1913; 1919). No entanto, apenas em 1921 é que se comprovou a responsabilidade dos flebótomos na transmissão de leishmanias, num estudo de Sergent e colaboradores (*fide* Théodoridès, 1997).

Devido ao aumento do número de casos de leishmaniose em Portugal, o kala-azar passou ter notificação obrigatória a partir de 1951, tendo sido registados 1616 casos, dos quais 1036 foram detectados na região do Alto Douro e 546 no Vale do Sado (Ramos & Farinhote, 1952; Azevedo 1960). Entre os anos 50 e o fim dos anos 70, Fraga de Azevedo e os seus colaboradores realizaram diversos estudos epidemiológicos, que realçaram a importância do cão e do flebotomo no ciclo biológico do parasita (Azevedo & Teixeira, 1947; Azevedo & Neves, 1963). Por todo o país, as campanhas de luta antimalárica iniciadas em 1948, erradicaram a malária e fizeram diminuir a incidência de kala-azar, principalmente no sul do país, até aos anos 70, provocando também uma diminuição na densidade de flebótomos (Azevedo, 1960). A partir desta altura tem-se observado um aumento progressivo da incidência da doença (Abranches & Pires, 1980), tendo-se, no entanto, verificado a extinção do foco endémico de Alcácer do Sal (Abranches *et al*, 1983b).

Actualmente estão bem identificados três focos endémicos principais de leishmaniose visceral, em Portugal: a Região do Alto Douro (RAD), a Região Metropolitana de Lisboa (RML) e a Região do Algarve (RA). O foco endémico mais importante situa-se na RAD onde a incidência é mais elevada, 8.3 casos/100000 habitantes/ano (Santos-Gomes *et al*, 1998), sendo a doença predominantemente rural. Estudos efectuados nesta região revelaram uma prevalência da infecção canina entre 10% e 12,4%, com a localidade de Vale de Mendiz (Terra Quente), no concelho de Alijó, a apresentar 37,8% de animais infectados, o valor mais elevado observado nos três inquéritos epidemiológicos realizados entre 1986 a 1989 (Abranches *et al*, 1992; 1993; Sampaio-Silva *et al*, 1993). No entanto, um estudo muito recente efectuado neste conselho, utilizando o teste de aglutinação directa (DAT), detectou uma sero-prevalência da infecção canina de 18,7%, com a região mais a Sul do Concelho a apresentar o valor mais elevado de sero-prevalência com

49,9%, em contraste com a região Intermédia na qual se observou 11,4% e com a região mais a Noroeste com 2,5% (Cardoso *et al*, 2004). Os isolados caninos de *Leishmania* foram identificados por análise isoenzimática, verificando tratar-se de *L. infantum* zimodemo MON-1. Quanto ao vector, apesar de *Ph. ariasi* ser mais abundante, foram encontrados parasitados tanto *Ph. perniciosus* como *Ph. ariasi*. As estirpes isoladas do vector foram identificadas como pertencendo à espécie *L. infantum* e aos zimodemos MON-1 e MON-24 (Pires *et al*, 1991).

Na Região Metropolitana de Lisboa a incidência era de 0.2 casos/100000 habitantes/ano em 1998 (Santos-Gomes *et al*, 1998), verificando-se mais casos de infecções humanas nas zonas urbanas do que nas áreas rurais. Inquéritos epidemiológicos realizados na RML revelaram que a prevalência da infecção canina era de 3,8% numa área urbana/suburbana, a variar desde 5,5% em Lisboa a 2,3% em Setúbal. Este valor foi, no entanto muito inferior ao encontrado numa área rural (8,8%), atingindo o máximo no Parque Natural da Serra da Arrábida, com uma prevalência de 10,9% (Abranches *et al*, 1987). A preferência zoofílica dos vectores e a disponibilidade de animais parecem ser as causas principais da diferença observada entre as zonas rurais e urbanas (Abranches *et al*, 1983a). No Parque Natural da Serra da Arrábida foram também estudadas 71 raposas, tendo-se observado que 5,6% estavam parasitadas, facto que sugere a existência de um ciclo silvático semi-autónomo neste local (Abranches *et al*, 1984). Os vectores encontrados nesta região foram *Ph. perniciosus* e *Ph. ariasi* (Pires, 1984).

Na Região do Algarve a incidência da leishmaniose visceral humana era de 1.2 casos/100000 habitantes/ano em 1998 (Santos-Gomes *et al*, 1998). Nesta região apenas a partir de 1980 foram identificados os primeiros casos autóctones (Maio *et al*, 1986). O Concelho com maior incidência desta doença é o de Loulé, onde de 1980 a 1988 foram diagnosticadas 43 crianças com LV (Vicente, 1990). Neste Concelho, foi ainda verificada uma prevalência da infecção canina de 7%, sendo por isso considerado o segundo foco endémico mais importante do país (Campino *et al*, 1995). *Ph. perniciosus* foi encontrado infectado por leishmaniose (Schrey *et al*, 1989), tendo mais tarde sido indentificada *L. infantum* MON-1 num exemplar infectado (Pires *et al*, 2001). Deste modo o principal vector responsável pela transmissão do parasita na RA é *Ph. perniciosus*, visto que a prevalência de *Ph. ariasi* é reduzida (Pires, 1979).

Em todo o país encontram-se, no entanto, casos esporádicos de LV, como, por exemplo, num rastreio serológico efectuado à população canina em 14 aldeias do distrito de Évora (Alentejo) onde foram encontrados 3.9% de animais infectados (Semião-Santos *et al*, 1995).

A partir da década de 90, o número de casos de LV em adultos começou a aumentar, seguindo a tendência de outros países da bacia mediterrânea, como Itália, França e Espanha.

Num estudo realizado em Portugal em 1405 indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos com suspeita clínica de LV, verificou-se que a prevalência observada em indivíduos imunocomprometidos era 9,7 vezes superior à observada em imunocompetentes (Campino, 1998). Por outro lado, nos doentes com co-infecção *Leishmania*/HIV foi detectada leishmaniose visceral provocada por estirpes dermatrópicas como MON-24 (Campino *et al*, 1994a) e MON-29 (Santos-Gomes *et al*, 1998). Nos indivíduos imunocomprometidos, foi ainda observada a presença de leishmanias na pele e no sangue (Campino *et al*, 1997). De facto, o isolamento de *L. donovani* MON-18 (nunca encontrada nos países da Bacia Mediterrânica) num indivíduo português imunocomprometido e toxicodependente que nunca saiu do país (Campino *et al*, 1994b) e idênticas observações obtidas por investigadores em outras áreas endémicas de leishmaniose (Martínez *et al*, 1993; Medrano *et al*, 1993) vieram reforçar a hipótese da existência de um ciclo de transmissão artificial da infecção. Vários autores sugeriram a possibilidade de ocorrer um ciclo antroponótico artificial de transmissão de *Leishmania* por via endovenosa através de fômites partilhados entre toxicodependentes (Alvar & Jiménez, 1994, Campino *et al*, 1994b), assim como, um ciclo de transmissão natural homem a homem através dos flebótomos (Molina *et al*, 1999).

A leishmaniose cutânea tem sido considerada uma doença muito rara em Portugal, apesar de, desde os anos 40 até à última década, casos esporádicos terem sido descritos, nas bacias hidrográficas dos rios Douro, Tejo e Sado (Ramos & Farinhote, 1952; Aguiar, 1970; Melo *et al*, 1996; Manso *et al*, 1998). Apesar de não ser tão frequente como em Itália e Espanha, onde existem focos endémicos (Bettini *et al*, 1990; Sanchez *et al*, 1995), foi identificado num caso autóctone português *L. infantum* MON-29 como a espécie causadora das lesões (Campino *et al*, 1997; Campino & Abranches, 2002).

## 2. Biologia do Parasita

### 2.1 Taxonomia

O género *Leishmania* Ross, 1903 é constituído por organismos unicelulares, eucariontes e heterotróficos que se reproduzem assexuadamente por fissão binária. Estes protozoários são considerados parasitas, pois dependem de outros seres vivos para sobreviverem e para se reproduzirem, levando a uma diminuição da qualidade de vida do hospedeiro.

A posição taxonómica e principais características do género *Leishmania* são:

- Reino PROTISTA Haeckel, 1866, eucariontes;
- Sub-reino PROTOZOA Goldfuss, 1817, unicelulares heterotróficos;
- Filo SARCOMASTIGOPHORA Honigberg & Balamuth, 1963, movimentação por flagelos;
- Sub-filo MASTIGOPHORA, Deising 1866, presença de um flagelo;
- Classe ZOOMASTIGOPHORA Calkins, 1909, ausência de cloroplasto;
- Ordem KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963 *emend.* Vickerman, 1976, DNA exterior ao núcleo, incluído no cinetoplasto;
- Subordem TRYPANOSOMATINA Rent, 1880, com flagelo, que quando livre pode formar membrana ondulante;
- Família TRYPANOSOMATIDAE Doflin, 1901 *emend.* Grobben, 1905, parasitas obrigatórios;
- Género *Leishmania* Ross, 1903, transmissão por flebotomídeos e hospedeiros mamíferos.

A classificação adoptada baseia-se na de Lainson & Shaw (1987), Rioux *et al* (1990) e Thomaz-Soccol *et al* (1993) englobando o género *Leishmania* dois subgéneros,

*Leishmania* Safjanova, 1982 que apresentam uma distribuição alargada no Velho e no Novo Mundo e *Viannia* Lainson e Shaw, 1987 que está limitada ao Novo Mundo, encontrando-se as leishmanias dos répteis agrupadas no género *Sauroleishmania*.

O método que tem sido mais utilizado para a caracterização subgenérica de *Leishmania* é o da tipagem isoenzimática, que aproveita o facto de *Leishmania* apresentar polimorfismos importantes que se exprimem sob a forma de electromorfos estáveis e relativamente específicos (Gardener *et al*, 1974). O conjunto de estirpes caracterizadas por possuírem o mesmo perfil isoenzimático, ou seja, a mesma mobilidade electroforética dos seus isoenzimas, denomina-se zimodemo, que forma uma unidade taxonómica elementar a qual se designa MON (Rioux *et al*, 1990). Apesar deste *taxon* não ter sido reconhecido pelo Código de Nomenclatura, é universalmente aceite na identificação de *Leishmania* ao nível da espécie e infraespécie (Dedet, 2000).

A análise isoenzimática é uma técnica morosa que requer a cultura dos parasitas e a obtenção do perfil de 10 a 20 enzimas, pelo que a utilização de métodos menos laboriosos como a tipagem génica baseada em técnicas de biologia molecular aplicadas a ácidos nucleicos como a reacção em cadeia da polimerase (PCR) e polimorfismos de dimensão de fragmentos de restrição (RFLP), apresentam grande potencial no estudo da variabilidade das leishmanias (Morales *et al*, 2001). A especificidade destas técnicas pode ser adaptada para identificar *Leishmania* ao nível do complexo, espécie ou mesmo do isolado (Cupolillo *et al*, 1995; Ramos *et al*, 1996; Katakura *et al*, 1998; Victoir *et al*, 1998; El Tai *et al*, 2001).

## 2.2 Morfologia

Durante o seu ciclo de vida este protozoário apresenta duas formas morfológicas distintas, uma forma extracelular designada promastigota, presente no aparelho digestivo de insectos dípteros da família Psychodidae (os flebótomídeos), e a forma amastigota intracelular obrigatória, parasita de vertebrados. Estas duas formas têm morfológicamente em comum um núcleo, um cinetoplasto e um corpo basal, entre outras características (Figura 1).

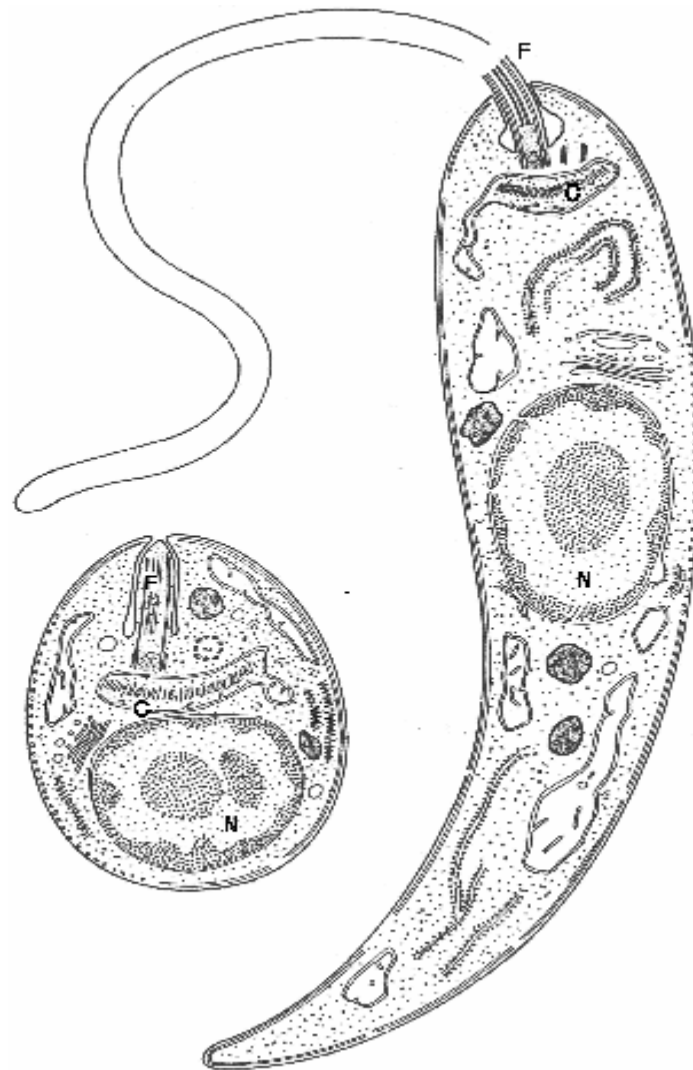
O promastigota tem uma forma tipicamente alongada, possui um flagelo, com tamanho variável, que emerge livremente na extremidade anterior da célula, associado ao corpo basal e que lhe confere mobilidade. O núcleo ocupa uma posição central e o cinetoplasto, ou mitocôndria modificada, que contém uma quantidade importante de DNA, situa-se entre aquele e a extremidade anterior da célula.

No tubo digestivo do insecto vector o parasita desenvolve-se, dando origem a duas formas principais morfológicamente distintas, as procíclicas e as metacíclicas. As formas procíclicas são curtas, mas maiores que os amastigotas (6 a 8  $\mu\text{m}$  de comprimento) e possuem o flagelo mais curto que o corpo celular, encontrando-se em divisão celular activa. Os promastigotas metacíclicos possuem, em geral, um corpo mais alongado e estreito, com um flagelo duas a três vezes mais comprido que o corpo celular e com grande mobilidade. Esta forma parece constituir a fase final do desenvolvimento sequencial do promastigota que ocorre no vector e é considerada infectante sendo inoculada no hospedeiro vertebrado (Sacks & Perkins, 1984; Killick-Kendrick, 1990; Lawyer *et al*, 1990).

As formas amastigotas são ovoides ou arredondadas, medem 2,5-6,8  $\mu\text{m}$  de comprimento, não possuem flagelo livre, o núcleo situa-se no pólo posterior da célula (Figura 1) e são obrigatoriamente intracelulares, podendo ser observados nas células fagocíticas monocucleares do hospedeiro vertebrado.



**Figura 1.** Representação esquemática das formas amastigota (A) e promastigota (B) de *Leishmania*, onde se podem observar o núcleo (N), o cinetoplasto (C) e o flagelo (F) (adaptado de Rey, 1972).



### 2.3 Ciclo de vida

As fêmeas dos vectores deste parasita necessitam de sangue para a maturação dos seus ovos, alimentando-se principalmente em mamíferos. Quando uma fêmea de flebótomo faz uma refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado infectado por

*Leishmania* e com parasitas na pele ou no sangue, ingere o protozoário que se encontra na forma amastigota (Figura 2).

Durante o desenvolvimento do parasita no vector podem distinguir-se promastigotas procíclicos, nectomonas, haptomonas, paramastigotas e promastigotas metacíclicos. Estas formas diferem não só morfologicamente, mas também na capacidade de divisão celular, mobilidade, ligação aos tecidos e grau de infectividade (Bates, 1994).

Tomando como modelo, o subgénero *Leishmania*, verificou-se que quando um flebótomo se alimenta, os amastigotas são ingeridos com a refeição sanguínea e passam directamente para o segmento abdominal do intestino médio do vector. O sangue estimula as células do intestino a segregar uma matriz proteica quitinosa que vai constituir a membrana peritrófica. Esta membrana envolve a refeição sanguínea em aproximadamente 4 horas, e fica completamente formada 24 horas após a ingestão do sangue (Molyneaux & Killick-Kendrick, 1987; Blackburn *et al*, 1988). Durante este período os parasitas mantêm-se imóveis. A membrana protege o epitélio do intestino do conteúdo da refeição sanguínea e actua como uma barreira que regula a difusão de enzimas digestivas segregadas pelas células epiteliais (Pimenta *et al*, 1997). A digestão da refeição sanguínea fica completa. Ao fim de quatro a cinco dias,

No decurso do seu desenvolvimento os parasitas sofrem várias alterações que lhes permite sobreviver à acção de lectinas (Svobodová *et al*, 1996) e enzimas proteolíticas do hospedeiro (Schlein, 1993), evitar serem expulsos do intestino e numa fase final, migrar para a zona anterior do intestino do vector e libertarem-se do epitélio intestinal, para que o ciclo de vida no insecto seja bem sucedido e consequentemente ocorra transmissão. Nas 24 horas seguintes à refeição sanguínea, os amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicos, que se dividem na zona abdominal do intestino médio. As formas procíclicas transformam-se em promastigotas longos (15 a 20  $\mu\text{m}$ ) e finos, designados por nectomonas, dois a três dias depois da refeição sanguínea. A membrana peritrófica começa a desintegrar-se devido às quitinases segregadas pelo vector e pelo parasita, o que acelera a libertação das nectomonas para o intestino médio (Schlein *et al*, 1991). Estas formas evitam a sua excreção pelo vector ligando-se pelo flagelo ao epitélio do intestino

médio, onde entram em processo de divisão activa, continuando a migrar em direcção ao segmento torácico do intestino médio. Cinco a seis dias após a ingestão do sangue, altura em que a refeição se encontra completamente digerida, as nectomonas começam a sua diferenciação em haptomonas e promastigotas metacíclicos.

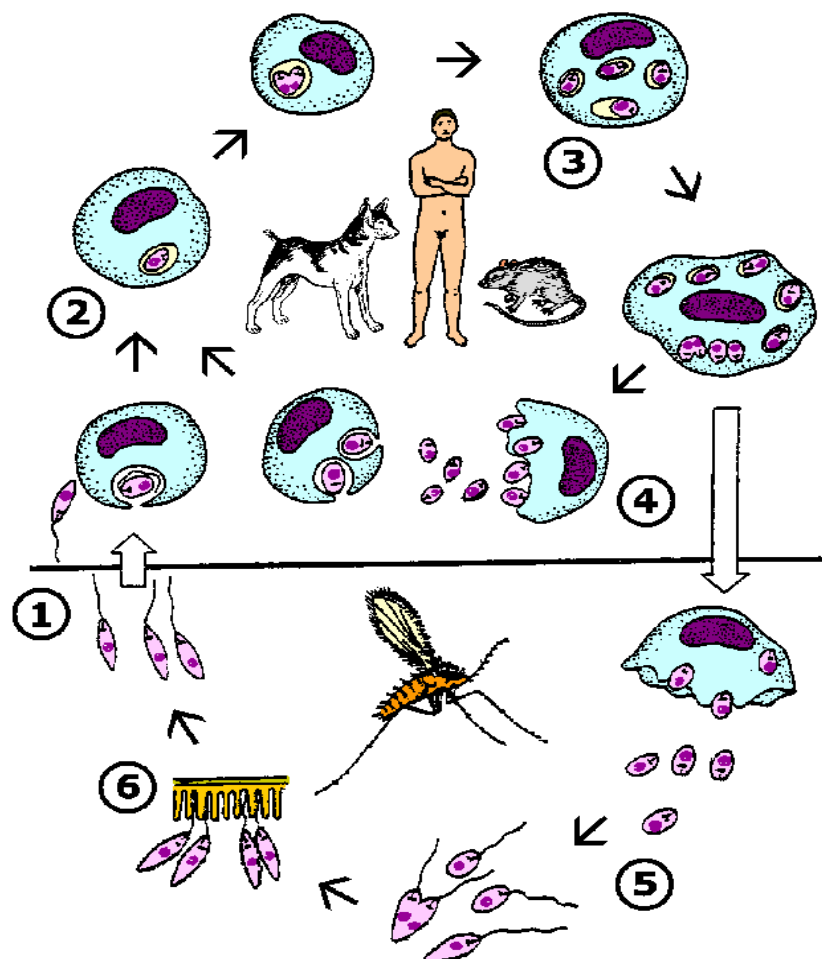
As haptomonas localizam-se na região da válvula estomodeal, aderindo à cutícula da válvula e também entre si, formando um aglomerado de parasitas embebidos numa matriz gelatinosa (Walters *et al*, 1987; Killick-Kendrick *et al*, 1988; Stierhof *et al*, 1999). Destas formas, algumas invadem o esófago e a faringe, transformando-se em paramastigotas (Schlein, 1993).

O desenvolvimento das formas metacíclicas ou infectantes, a partir das nectomonas encontra-se associado a modificações ultraestruturais no lipofosfoglicano (LPG) da superfície dos parasitas, que causam alterações funcionais como a perda da ligação às microvilosidades do intestino (Sacks *et al*, 1995). Também a glicoproteína de 63 kDa (gp63) e a fosfatase ácida, parecem ser importantes nesta fase, particularmente no que diz respeito à infecciosidade (Bryceson, 1996). As formas metacíclicas, passam pelo esófago e faringe, e na próxima refeição do flebótomo, são injectados num hospedeiro. As formas não infectantes não são inoculadas e pensa-se que servem para dificultar a entrada do sangue durante a refeição sanguínea, pelo bloqueio que exercem na região da válvula estomodeal, obrigando o insecto a realizar várias picadas, o que facilita a expulsão das formas livres infectantes (Killick-Kendrick & Ward, 1981; Beach *et al*, 1985; Killick-Kendrick *et al*, 1997).

No insecto, o desenvolvimento do parasita pode demorar de 4 a 17 dias para se completar, dependendo da espécie de *Leishmania* (Molyneaux & Killick-Kendrick, 1987).

Os promastigotas metacíclicos são inoculados juntamente com secreções salivares do flebótomo, cuja acção tem sido estudada e que pode influenciar a evolução da infecção no hospedeiro vertebrado, facilitando a infectividade do parasita (Titus & Ribeiro, 1988) por inibição da capacidade leishmanicida dos macrófagos (Hall & Titus, 1995; Lima & Titus, 1996; Waitumbi & Warburg, 1998).

**Figura 2.** Representação esquemática do ciclo de vida de *Leishmania* (adaptado de K.P. Chang, 2003). 1- Os promastigotas metacíclicos são inoculados no hospedeiro vertebrado quando o vector faz a sua refeição sanguínea; 2 – Os promastigotas são fagocitados pelos macrófagos e transformam-se em amastigotas; 3 – Os amastigotas começam a multiplicar-se por fissão binária dentro dos macrófagos; 4 – As novas formas amastigotas invadem outros macrófagos, após destruição da célula onde se dividiram; 5 – Após o flebótomídeo ingerir sangue do hospedeiro vertebrado, os amastigotas transformam-se em promastigotas e multiplicam-se por fissão binária. Os promastigotas procíclicos aderem ao epitélio do intestino médio para não serem expelidos e continuarem a sua multiplicação; 6 – Transformação em promastigotas metacíclicos com maior infecciosidade para o hospedeiro e inoculação no hospedeiro vertebrado quando o insecto faz nova refeição sanguínea.



Estudos posteriores mostraram ainda que a exposição prévia de murganhos a picadas de flebótomos não infectados induzia uma forte resposta celular conferindo imunidade a uma posterior infecção por *Leishmania* (Belkaid *et al*, 1998; Kamhawi *et al*, 2000). Estes resultados, em conjunto com a elevada imunogenicidade demonstrada por proteínas da saliva dos flebótomos, reforçam a importância da saliva no estabelecimento da infecção por *Leishmania* no vertebrado.

No mamífero hospedeiro, os promastigotas metacíclicos ficam expostos aos efeitos potencialmente letais do complemento. Os macrófagos da pele fagocitam os parasitas, e vários são os factores que determinam a sua transformação em amastigotas. Este processo é caracterizado pelo arredondamento do organismo e perda do flagelo livre. No interior do fagolisosoma, inicia-se uma fase de multiplicação activa, que mostra uma excelente adaptação a um meio hostil e culmina com a ruptura do macrófago e subsequente libertação dos amastigotas.

Os parasitas fagocitados pelos macrófagos permanecem no tecido cutâneo, dando origem às formas clínicas de LC ou invadem as células do sistema mononuclear fagocítico, nomeadamente do baço, do fígado, da medula óssea e dos gânglios linfáticos causando a LV (Bryceson, 1996). O ciclo de vida do parasita completa-se quando as formas amastigotas serão ingeridas pelo vector durante a refeição sanguínea (Figura 2).

### **3. Interacção Parasita-Hospedeiro**

O estabelecimento da infecção por *Leishmania* depende da interacção entre o parasita e o hospedeiro. Quando o hospedeiro vertebrado é invadido por promastigotas, desencadeiam-se um conjunto de reacções, que envolvem a imunidade inata e adquirida. Na LV a resposta imunológica inclui as componentes humoral e celular. A elevada produção de anticorpos, que não são protectores caracteriza a resposta humoral, enquanto que a resistência à infecção está associada

a uma resposta celular com a participação de células T CD<sup>2</sup>4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Stern *et al*, 1988; Murray *et al*, 1992). Por outro lado o parasita dispõe de várias estratégias para sobreviver ao sistema de defesa do hospedeiro, nomeadamente a resistência aos componentes do soro, a sobrevivência no interior dos fagolisossomas dos macrófagos e a modulação da acção imunológica das células T.

### 3.1 Modelos animais

A utilização de animais é importante, não só porque muitos deles são reservatórios naturais da doença, como através deles se podem tirar conclusões acerca das diferentes interações que ocorrem entre o parasita e o hospedeiro. Nos modelos experimentais da leishmaniose que têm sido utilizados incluem-se os primatas não humanos, os cães, os roedores, incluindo os hamsters e principalmente, os murganhos (Hommel *et al*, 1995).

Nos primatas foi essencialmente estudada a LC no Novo Mundo, utilizando espécies como *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (Lainson & Shaw, 1977).

Por outro lado, o cão tem sido utilizado principalmente em estudos de LV causada por *L. infantum*, pois para além de constituir o principal reservatório do parasita, apresenta muitas características semelhantes à doença visceral humana (Abranches *et al*, 1991b; Hommel *et al*, 1995). No entanto, este modelo é muito dispendioso, parte dos reagentes necessários aos estudos imunológicos não é comercializada e apresenta dificuldades de acomodação e de manipulação laboratorial.

Os roedores constituem o modelo animal mais utilizado, pois apesar de apresentar muitas diferenças em relação ao Homem, o que limita as possíveis extrapolações (Almeida *et al*, 2003), possuem também muitas vantagens económicas e de manipulação. Nos murganhos a disponibilidade de reagentes para a realização dos estudos é vasta. Assim, têm contribuído para o avanço do conhecimento das leishmanioses a vários níveis, proporcionando um elevado número de trabalhos, com especial destaque para os mecanismos de evasão desencadeados pelo parasita e ao tipo de resposta imunitária que os hospedeiros resistentes e sensíveis

---

<sup>2</sup>CD- “Cluster of Differentiation” –designação internacional atribuída a moléculas da superfície dos leucócitos e plaquetas, que permite diferenciar sub-populações celulares

desenvolvem (Belkaid *et al*, 2001; Uzonna & Bretscher, 2001; Uzonna *et al*, 2001; Almeida *et al*, 2003).

### **3.2 Resposta imunológica inata**

Estima-se que o hospedeiro seja capaz de desenvolver uma resposta protectora eficaz contra cerca de 98 % dos agentes patogénico invasores, através da primeira linha de defesa que é a resposta imunológica inata (Jones, 2000).

Os mecanismos imunológicos não específicos são muito importantes no controlo ou eliminação dos parasitas e na resistência a *Leishmania*, actuando no início da infecção (Laskay *et al*, 1995). A produção de quimiocinas e citocinas, o complemento, as células fagocitárias e a sua actividade microbicida estão incluídas nestes mecanismos.

#### **3.2.1 Resistência aos componentes citotóxicos do soro**

O complemento compreende elementos com funções de activação, regulação e sinalização que intervêm numa resposta imunológica primária, e cujos objectivos são a opsonização, lise de células ou de microrganismos, recrutamento e activação das células fagocitárias.

Os mecanismos que *Leishmania* possui para escapar à acção do complemento são dos mais elaborados entre os vários parasitas, já que este protozoário não só evita a actividade lítica do complemento, como explora a capacidade de opsonização e quimiotaxia do mesmo (Zambrano-Villa *et al*, 2002).

Vários autores verificaram que as leishmanias activam o complemento quer pela via alternativa (Mosser & Edelson, 1984) quer utilizando componentes da via clássica (Pearson & Steigbigel, 1980; Puentes *et al*, 1988). Neste processo estão implicadas as moléculas gp63 e o LPG, que são as moléculas mais abundantes na superfície da membrana plasmática de *Leishmania*. Estas moléculas fixam o componente C3 do complemento (Russel, 1987; Puentes *et al*, 1988), mas a fosforilação deste e dos componentes C5 e C9 por cinases do próprio parasita pode bloquear a activação da cascata do complemento (Hermoso *et al*, 1991; Sacerdoti-Sierra *et al*, 1997).

Por outro lado, a resistência ao complemento é ainda aumentada pela capacidade dos parasitas libertarem espontaneamente da sua superfície os complexos C5b-C9 do complemento (Puentes *et al*, 1990). Isto ocorre provavelmente devido ao alongamento do fosfoglicano do LPG, observado nas formas metacíclicas (Sacks *et al*, 1995), que assim funciona como uma barreira física à inserção dos complexos C5b-C9 na membrana plasmática do parasita (Brittingham & Mosser, 1996).

A conversão proteolítica do componente C3b em C3bi pela metaloproteinase gp63, na membrana plasmática de *Leishmania* (Brittingham *et al*, 1995), facilita a ligação do parasita aos macrófagos pelo receptor do complemento CR3 (Rosenthal *et al*, 1996) e a sua fagocitose (Alexander & Russel, 1992; Mosser & Rosenthal, 1993). Os macrófagos são também atraídos pelos promastigotas opsonizados (Bray, 1983), o que permite o recrutamento de potenciais células hospedeiras de *Leishmania* para a zona inicial da infecção.

No entanto, apenas as formas metacíclicas são resistentes ao complemento (Franke *et al*, 1985) o que parece estar associado a modificações nas moléculas gp63 e LPG. De facto, durante o processo de metaciclogénese dos promastigotas, observado quer *in vivo* quer *in vitro*, a gp63 aumenta a sua expressão assim como a sua actividade proteolítica (Kweider *et al*, 1987; Murray *et al*, 1990; Santos-Gomes & Abranches, 1996). Também o LPG modifica a sua estrutura molecular durante o desenvolvimento das formas metacíclicas (Davies *et al*, 1990; Grimm & Jenni, 1993; Pimenta *et al*, 1994), promovendo posteriormente a fagocitose e o estabelecimento da infecção. Assim, os promastigotas metacíclicos aproveitam os efeitos opsonímicos e quimiotáticos do complemento e ao mesmo tempo evitam os seus efeitos líticos (Mosser & Edelson, 1987; Brittingham & Mosser, 1996). Além destas duas moléculas, também as proteínas de choque térmico estão envolvidas na activação do complemento, bem como na prevenção do estresse térmico, impedindo a lise do parasita quando passa do vector, a uma temperatura de cerca de +25°C, para o hospedeiro vertebrado que tem uma temperatura corporal mais elevada (Puentes *et al*, 1988; Turco, 1988; Chang, 1993).



### 3.2.2 Sobrevivência nas células do hospedeiro vertebrado

Após a fagocitose, os promastigotas são tipicamente encontrados no vacúolo parasitóforo ou fagossoma, apesar de em alguns estudos os parasitas terem sido também observados no citoplasma (Akiyama & Haight, 1971; Rittig *et al*, 1998). Dentro do fagossoma, o LPG promove a sobrevivência do parasita. Os mecanismos utilizados incluem, a inibição da fusão dos lisossomas com os fagossomas (Desjardins & Descoteaux, 1997), evitando que os radicais oxidativos atinjam a superfície dos parasitas (Chan *et al*, 1989), e o bloqueio da respiração oxidativa por diminuição da actividade das cinases C (Olivier *et al*, 1992; Descoteaux & Turco, 1993).

Estes mecanismos de sobrevivência possibilitam a transformação da forma promastigota em amastigota, que é mais resistente a enzimas e ao pH ácido do fagolisossoma.

Na eventual formação do fagolisossoma a protease gp63 assume um papel protector, inibindo as enzimas degradativas provenientes dos lisossomas (Sorensen *et al*, 1994; Seay *et al*, 1996). No entanto, o macrófago tem a capacidade de sintetizar óxido nítrico (NO) que contribui para a destruição de *Leishmania*. Numa fase inicial da infecção e na ausência de activadores do macrófago, o parasita através do LPG e de glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) consegue inibir a enzima sintetase induzida do óxido nítrico (iNOS), responsável pela síntese do NO (Proudfoot *et al*, 1995; 1996). A diferenciação dos promastigotas em amastigotas ocorre cerca de 48 horas após a fagocitose. As formas amastigotas são metabolicamente mais activas a um pH baixo estando, por isso, mais adaptadas ao meio ambiente do interior do fagolisossoma que possui um pH 3-5. Esta adaptação ao meio ácido permite a entrada de metabolitos essenciais, como glucose e bases pirimidicas, através da eliminação de protões ( $H^+$ ), o que explica a sua surpreendente capacidade de sobrevivência nestas condições adversas (Bogdan *et al*, 1990, Roitt *et al*, 1996). Mais ainda, a actividade enzimática da fosfatase ácida, superóxido dismutase e catalase, que na forma promastigota era reduzida, encontra-se aumentada na forma amastigota, de modo a interferir na degradação de produtos tóxicos e no bloqueio da produção de metabolitos oxidativos (Glew *et al*, 1988; Bogdan *et al*, 1990).

A infecção por *Leishmania* induz a expressão de proteínas inflamatórias dos macrófagos  $1\alpha$  e  $1\beta$  (MIP- $1\alpha$  e MIP- $1\beta$ ). Estas quimiocinas medeiam o recrutamento de novos monócitos/macrófagos para o local da infecção, facilitando assim a expansão do parasita (Buates & Matalashewski, 2001). Outros estudos demonstram que o parasita inibe o processo de apoptose dos macrófagos infectados (Moore & Matlashewski, 1994), contribuindo para a sua própria dispersão (Lüder *et al*, 2001).

Foram também descritos casos de infecção por *Leishmania* em células ou linhas celulares com origem não-monocítica ou macrofágica. Entre eles neutrófilos infectados *in vitro* (Chang, 1981; Pearson & Steigbigel, 1981) e *in vivo* (Santos-Gomes *et al*, 2000a; Rousseau *et al*, 2001; Aga *et al*, 2002), mastócitos infectados *in vitro* (Bidri *et al*, 1997), células dendríticas *in vivo* (Blank *et al*, 1993; Moll *et al*, 1995) e fibroblastos *in vivo* (Bogdan *et al*, 2000). A capacidade de fagocitose nos mamíferos não está restrita às células fagocíticas “profissionais” (macrófagos, monócitos e neutrófilos), pelo que a presença de outros tipos celulares infectados por *Leishmania* não seja inesperada (Rittig & Bogdan 2000). Na realidade foi demonstrado que células de Langerhans, as células dendríticas da pele, não permitem a replicação de *Leishmania*, mas também não destroem o parasita, sendo permissivas à sua presença (Blank *et al*, 1996). Assim, a capacidade de *Leishmania* permanecer neste tipo de células poderá contribuir para a persistência de um número reduzido de parasitas no hospedeiro vertebrado, funcionando como uma estratégia adicional de sobrevivência (Bogdan & Rölinghoff 1998).

### 3.3 Resposta imunológica adquirida

O parasita necessita de sobreviver à resposta imunológica adquirida de forma a estabelecer uma infecção crónica por um longo período de tempo.

Os macrófagos têm um papel fundamental na iniciação da resposta adquirida, uma vez que participam na apresentação antigénica, na estimulação das células T e na produção de citocinas reguladoras das células T.

### 3.3.1 Apresentação antigénica e indução de uma resposta linfocitária

Os péptidos apresentados pelas moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) à superfície celular são o factor determinante para a especificidade das células T. Estes determinantes peptídicos resultam do processamento de antígenos e posterior associação às moléculas da classe I do MHC (MHC I) em todos os tipos celulares do organismo ou associação às moléculas da classe II do MHC (MHC II) nas células apresentadoras de antígenos (APCs) (Allen *et al*, 1987; Germain & Margulies, 1993). Existem três tipos principais de APCs, nomeadamente macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Os macrófagos são as únicas células tipicamente fagocitárias e que simultaneamente têm capacidade de apresentação antigénica. Contudo, nestas células, as moléculas MHC II não estão continuamente a ser expressas, sendo este processo induzido na presença de citocinas como o interferão gama (IFN $\gamma$ ). As células dendríticas, e em especial as células de Langerhans na pele, expressam constitutivamente níveis elevados de moléculas MHC II sendo consideradas as APCs por excelência. Para que ocorra reconhecimento de péptidos antigénicos associados às moléculas MHC pelas células T, o antígeno necessita de ser processado, isto é, ser submetido à acção de proteases. As duas vias principais de processamento do antígeno, incluem as proteínas ou microrganismos provenientes do meio extracelular que através de endocitose, vão localizar-se em compartimentos celulares ácidos e dão origem a determinantes peptídicos que se associam com as moléculas MHC II, enquanto que proteínas que se encontram intracelularmente no citoplasma são processadas e estabelecem ligação com as moléculas MHC I (Germain & Malissen, 1986; York & Rock, 1996).

Na interacção entre APCs e linfócitos T participam também moléculas de co-estimulação B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) presentes à superfície das APCs e reconhecidas pelos receptores CD28 (sinal de co-estimulação positiva) e CD152 (CTLA-4) (sinal de co-estimulação negativa) à superfície das células T.

As células T “naive”, isto é, sem experiência prévia de contacto com antígenos, após o encontro com péptidos parasitários associados às moléculas MHC passam a

células T efectoras, expressando na sua superfície celular antígenos típicos de activação, como a molécula CD69 e o receptor da interleucina (IL)-2 (CD25).

Após estimulação, as células T CD4<sup>+</sup> podem diferenciar-se funcionalmente em duas sub-populações, T “helper” 1 (Th1) e T “helper” 2 (Th2), que produzem padrões de citocinas típicos. Assim, numa resposta do tipo Th1 são produzidos IFN $\gamma$  e IL-2, enquanto que as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 são típicas de uma resposta do tipo Th2 (Mosmann *et al*, 1986; Mosmann & Coffman, 1989). A estimulação primária das células T não induz apenas a diferenciação de células efectoras, mas também conduz ao desenvolvimento de uma população de células de memória, as quais são essenciais no controlo da infecção durante uma resposta imunológica secundária.

### 3.3.2 As células T

Nas infecções por *Leishmania* o controlo do parasitismo (resistência à doença), ou seja, uma resposta imunológica protectora, deve-se ao predomínio das células CD4<sup>+</sup> Th1. O IFN $\gamma$  apresenta uma grande capacidade de activação dos mecanismos leishmanicidas do macrófago (Sadick *et al*, 1986; Green *et al*, 1990; Liew *et al*, 1990; Scott, 1991; Assreuy *et al*, 1994). A progressão para a doença está relacionada com o predomínio de células T CD4<sup>+</sup> Th2 (Heinzel *et al*, 1989; Reed & Scott, 1993), que por sua vez inibem a produção de citocinas associadas a uma resposta Th1. Para algumas espécies de *Leishmania*, como *L. major*, o predomínio de uma resposta do tipo Th2 conduz à exacerbação da doença (Locksley *et al*, 1987; Heinzel *et al*, 1989). Contudo outros estudos sugerem que é a incapacidade de estabelecer uma resposta Th1 mais do que a presença de uma resposta Th2, que determina a susceptibilidade à infecção (Noben-Trauth *et al*, 1996). Abordagens efectuadas com *L. donovani* (Kaye *et al*, 1991; Murray, 1997) e com *L. chagasi* (Wilson *et al*, 1996) apontam para a não existência de uma total correspondência entre respostas imunitárias Th1 e Th2 e resistência/susceptibilidade à infecção. Apesar destas observações sugerirem a possibilidade de existirem outros factores que intervenham de forma decisiva na evolução ou regressão da infecção, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> continuam a ser considerados fundamentais nas respostas imunológicas à infecção por *Leishmania*.

Para além do papel fulcral de uma resposta Th1 no controlo da infecção, as células T CD8<sup>+</sup> têm também revelado uma função importante na eliminação do parasita na infecção por espécies viscerotrópicas, em especial em órgãos não-linfóides como o fígado (Murray *et al.*, 1992; Ahmed *et al.*, 2003). Desde 1992 que se sabe que as células T CD8<sup>+</sup> se dividem em duas subpopulações (Tc1 e Tc2). Esta divisão é baseada no tipo de citocinas que aquelas subpopulações expressam, que são essencialmente as mesmas que as produzidas pelas células CD4<sup>+</sup> Th1 e Th2. Para além de que, as células CD8<sup>+</sup> não funcionam unicamente como células efectoras responsáveis pela morte de células alvo, mas também estão envolvidas na modulação da resposta imunológica (Cox, 1997).

Os primeiros estudos, realizados em murganhos geneticamente sensíveis infectados com *L. major*, sugeriram que as células T CD8<sup>+</sup> poderiam estar relacionadas com a resistência à infecção (Hill *et al.*, 1989; Muller *et al.*, 1991). Mais tarde, Muller *et al.* (1993) observaram que o IFN $\gamma$ , produzido em grande quantidade pelas células T CD8<sup>+</sup> do baço e dos gânglios linfáticos de murganhos geneticamente resistentes e sensíveis infectados uma segunda vez com *L. major*, estava directamente implicado na activação da memória imunológica. Em doentes com leishmaniose cutânea americana causada por *L. braziliensis* foi observado, após cura, o aumento de células T CD8<sup>+</sup> e dos níveis de IFN $\gamma$  e a diminuição das células T CD4<sup>+</sup> (Da-Cruz *et al.*, 1994).

As células T CD8<sup>+</sup> também têm sido implicadas no controlo da leishmaniose visceral. Estudos efectuados em murganhos inoculados com *L. donovani* e *L. infantum* indicaram que as células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e "Natural Killer" (NK) e as citocinas IFN $\gamma$ , IL-2 e factor de necrose tumoral (TNF) $\alpha$  participam no controlo da infecção primária (Murray & Hariprashad, 1995a; Murray *et al.*, 1995b; Mary *et al.*, 1999). Num estudo recente, realizado em murganhos com fenótipo de "cura" e de "não cura" infectados com *L. infantum*, detectaram-se, durante o estabelecimento da infecção, elevados níveis de factor transformador do crescimento (TGF)  $\beta$  e a ausência de uma resposta do tipo Th1, o que pode ter contribuído para a multiplicação do parasita no fígado. No decurso da infecção ocorreu simultaneamente um aumento no número e na activação das células CD8<sup>+</sup> e a eliminação dos parasitas, mas esta observação foi apenas significativa na estirpe de

murganhos com fenótipo de “cura”. Os resultados deste trabalho apontam para um papel importante das células T CD8<sup>+</sup> na resposta imunológica adquirida (Gomes-Pereira *et al*, 2004a). Nestas duas estirpes de murganhos foi também observada uma correlação entre a dinâmica das subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de memória (CD62L<sup>low</sup>/CD45RB<sup>low</sup>) no fígado e o fenótipo pré-activado dos linfócitos (CD62L<sup>low</sup>/CD45RB<sup>high</sup>) do baço, sugerindo que este órgão é a fonte de linfócitos T específicos de *Leishmania* que migram para o fígado, onde a multiplicação parasitária é particularmente activa. No fígado, estas células pré-activadas tornam-se linfócitos T efectores, no entanto, foi verificada uma forte regulação das células T CD8<sup>+</sup> efectoras, prevenindo possivelmente a destruição do tecido hepático (Gomes-Pereira *et al*, 2004b). Nas células mononucleares do sangue periférico de cães assintomáticos, experimentalmente infectados com *L. infantum*, foi verificada a presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Porém, estas células não foram detectadas em cães que desenvolveram sinais clínicos da infecção (Pinelli *et al.*, 1995).

Na indução e manutenção de uma resposta Th1 são determinantes vários factores como a natureza, quantidade e forma (solúvel ou precipitada) do péptido antigénico (Constant *et al*, 1995; Hoskens *et al*, 1995; Skeiky *et al*, 1995), a presença à superfície das APCs de moléculas de co-estimulação B7-1 e B7-2 (Brown *et al*, 1996), o tipo de APCs (Will *et al*, 1992; Croft & Dubey, 1997; Konecny *et al*, 1999) e a síntese das citocinas IL-4 e IL-12 (Sedlik, 1996).

Por outro lado, o reconhecimento do antígeno é efectuado de uma forma específica, isto é, a célula T de determinado haplótipo MHC reconhece antígenos associados a moléculas MHC do mesmo haplótipo (restrição MHC).

Vários estudos com macrófagos infectados *in vitro* demonstraram que as formas amastigotas de *Leishmania* podem levar a uma diminuição nos níveis de moléculas MHC II à superfície dos macrófagos (Reiner *et al*, 1987; Kwan *et al*, 1992). Simultaneamente, estes parasitas impedem que as moléculas do MHC II tenham acesso aos antígenos parasitários, já que levam à internalização e degradação destas moléculas no interior do vacúolo parasitóforo (De Souza-Leão *et al*, 1995), assim como à retenção dos antígenos num compartimento endocítico (Kima *et al*, 1996). Deste modo, o parasita aumenta a sua própria capacidade de sobrevivência, regulando o processamento dos seus antígenos e dificultando a detecção de macrófagos infectados pelo hospedeiro. Também a expressão de moléculas de co-

estimulação, indispensáveis a uma eficiente activação das células T, é alterada em macrófagos infectados por *Leishmania*, verificando-se a redução da expressão das moléculas B7 em células parasitadas (Kaye *et al*, 1994; Pinelli *et al*, 1999; Almeida *et al*, 2003). Este mecanismo poderá ser responsável pela activação das moléculas de co-estimulação negativa CTLA-4, que têm maior afinidade para as moléculas B7 do que o receptor CD28, conduzindo ao bloqueio do processo de activação normal das células T. Deste modo, os linfócitos dão início a uma cascata de reacções que os levam à morte por apoptose. Na verdade, alguns trabalhos demonstraram a indução de apoptose de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em animais infectados por *Leishmania* (Das *et al*, 1999; Bertho *et al*, 2000). A molécula LPG do parasita é o potencial responsável pela regulação deste mecanismo (Wolday *et al*, 1999), inibindo o desenvolvimento de uma resposta imunológica anti-leishmania. Também a gp63 dificulta a interacção entre APCs e as células T CD4<sup>+</sup>, através da degradação das moléculas CD4, interferindo com o estabelecimento de uma ligação estável entre os dois tipos celulares (Locksley *et al*, 1993).

### 3.3.3 A produção de citocinas

O estado de activação dos macrófagos e das células T depende do equilíbrio entre citocinas estimuladoras e inibidoras. A acção moduladora da produção de citocinas importantes na estimulação das células T e também dos macrófagos exercida por *Leishmania*, contribui provavelmente para a sua própria sobrevivência.

A IL-12, produzida sobretudo por macrófagos e células dendríticas, é essencial no desencadear de uma resposta do tipo Th1. Macrófagos infectados por *Leishmania* apresentam níveis reduzidos de IL-12, ao contrário das células dendríticas não parasitadas que aumentam a produção desta citocina no local de infecção (Reiner *et al*, 1994; Gorak *et al*, 1998). A citocina IL-12 é ainda importante na indução da produção de IFN $\gamma$  pelas células NK, as quais participam na resposta inespecífica contra vários microrganismos como *Listeria*, *Mycobacterium* e *Toxoplasma* (Bancroft *et al*, 1991; Bancroft, 1993; Hunter *et al*, 1996). Na leishmaniose visceral, a produção de IFN $\gamma$  pelas células NK durante uma fase inicial da infecção parece estar dependente da produção de IL-12 pelas células dendríticas (Gorak *et al*, 1998).

Contudo, no modelo murino, vários estudos têm demonstrado que a libertação de IFN $\gamma$  pelas células NK não é determinante na evolução da parasitose (Kaye & Bancroft, 1992; Murray *et al*, 1995b).

A produção de outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e o TNF $\alpha$ , importante indutor da enzima iNOS, encontra-se também reduzida em macrófagos infectados (Reiner, 1987; Descoteaux & Matlashewski, 1989; Carrera *et al*, 1996; Hatzigeorgiou *et al*, 1996), o que conduz a uma menor capacidade leishmanicida do macrófago e também a uma resposta inflamatória menos acentuada.

Contrariamente, as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e principalmente o TGF- $\beta$  apresentam níveis aumentados nos macrófagos infectados por *Leishmania*, de modo a inibir a actividade leishmanicida do macrófago (Barral *et al*, 1993; Bogdan & Nathan, 1993; Stenger *et al*, 1994). Estas citocinas são também produzidas por uma sub-população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, as células T reguladoras (Tr) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, que atenuam ou suprimem respostas imunológicas do tipo Th1 e Th2, de forma a manter a homeostasia imunológica. A actividade das Tr pode favorecer a persistência do parasita (Belkaid *et al*, 2002).

*Leishmania*, para além de intervir na regulação de citocinas pró e anti-inflamatórias, tem capacidade de interferir na activação desencadeada pelo IFN $\gamma$ . Após a ligação do IFN $\gamma$  ao receptor dos macrófagos, inicia-se uma sequência de reacções que levam à transcrição de diversos genes, alguns dos quais expressam proteínas necessárias à activação do macrófago. *Leishmania* utiliza mecanismos que suprimem a fosforilação de algumas dessas proteínas, por exemplo, as que são indispensáveis à efectiva activação dos macrófagos, assegurando deste modo a sua persistência nas células (Nandan & Reiner, 1995; Blanchette *et al*, 1999; Ray *et al*, 2000).

Vários estudos, com leishmaniose cutânea têm mostrado que a produção de IL-4 nas primeiras horas da infecção é um evento crítico no desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2 e assim na exacerbação da infecção (Chatelain *et al*, 1992; Kopf *et al*, 1996; Launois *et al*, 1997). Nestes estudos, a IL-4 é produzida por células T CD4<sup>+</sup> que reconhecem um determinante peptídico do parasita derivado do antígeno LACK (Mougneau *et al*, 1995; Pingel *et al*, 1999), comprovando-se que células T LACK-específicas são fundamentais na susceptibilidade à infecção.



Contudo, este fenótipo só se manifesta em determinadas estirpes de murganhos (Julia *et al*, 1996; Launois *et al*, 1997).

### 3.4 Factores de virulência

Um dos factores relacionados com o hospedeiro e o parasita no estabelecimento de uma infecção parasitária é o grau de virulência, que se define como a capacidade que o agente patogénico tem de invadir os tecidos, multiplicar-se e produzir efeitos tóxicos (Cruickhank, 1973). Portanto, as manifestações clínicas da leishmaniose resultam, para além dos determinantes imunitários do hospedeiro, dos determinantes invasivos do parasita, nomeadamente das moléculas de superfície e intra-celulares, que são um pré-requisito para a virulência de *Leishmania* (Chang, 1993).

Os factores de virulência utilizados por *Leishmania* são diversos, variando entre as diferentes espécies do parasita e possivelmente em diferentes hospedeiros (Turco *et al*, 2001). As leishmanias expressam à sua superfície uma grande variedade de glicoconjugados incluindo LPG, GPIs assim como a gp63 (McConville & Ferguson, 1993; Ilg *et al*, 1999). Algumas moléculas como o fosfoglicano, proteofosfoglicano e a fosfatase ácida, são também libertadas pelo parasita. Destas moléculas, algumas são importantes factores de virulência do parasita, em especial o LPG e a gp63. Estudos efectuados com promastigotas mutantes, deficientes na expressão de LPG ou gp63, ou com produção de LPG e gp63 modificados, têm permitido definir a importância destas moléculas na sobrevivência de *Leishmania* (Beverly & Turco, 1998; Chen *et al*, 2000).

O LPG está presente em abundância em todos os estadios dos promastigotas, especialmente na fase metacíclica. Contudo, os promastigotas mantidos *in vitro* durante períodos de tempo relativamente longos, apresentam diminuição da quantidade de LPG expressa à superfície celular (Sacks *et al*, 1990, Killick-Kendrick & Rioux, 1991). *In vitro*, promastigotas de *L. major* deficientes na expressão de LPG foram fagocitados por macrófagos, mas não se transformaram em amastigotas, sendo eliminados em 48 horas (Späth *et al*, 2000), indicando uma perda de virulência destes promastigotas. Quando *L. mexicana* foi submetida a condições idênticas, a deficiência em LPG não alterou a sua capacidade de infecção e multiplicação nos macrófagos (Ilg, 2000), concluindo-se que esta molécula não é um

factor determinante da virulência desta espécie de *Leishmania*. Do mesmo modo, gp63-mutantes de diferentes espécies de *Leishmania*, mostraram comportamentos variáveis na capacidade de infectar os macrófagos (Joshi *et al*, 1998), evidenciando mais uma vez a utilização diferencial e específica dos potenciais factores de virulência. Nas formas promastigotas atenuadas de *L. major*, *L. mexicana* e *L. infantum* MON-1 a expressão desta proteína é reduzida, o que não acontece nas formas promastigotas virulentas das mesmas espécies (Chaudhuri & Chang, 1988, Wilson *et al*, 1989, Santos-Gomes, 1995). Deste modo, as estratégias de evasão de *Leishmania* ao sistema imunológico do hospedeiro não parecem ser idênticas para as diferentes espécies, podendo haver variabilidade específica ou mesmo infraespecífica.

A gp63 é uma das proteínas mais abundantes da superfície da membrana celular de *Leishmania*, em ambas as formas morfológicas, existindo, no entanto em menor quantidade nos amastigotas (Bahr *et al*, 1993). Verifica-se que a expressão da gp63 é mais elevada quando os promastigotas de cultura entram na fase estacionária de crescimento, sendo também, mais infecciosos, como foi observado com *L. brasiliensis* (Kweider *et al*, 1987, Murray *et al*, 1990, Ramamoorthy *et al*, 1992). Foram detectados títulos elevados de anticorpo anti-gp63 em indivíduos com kala-azar, o que confirma a presença desta proteína nos amastigotas (Shreffler *et al*, 1993).

Outras proteínas, como por exemplo, as proteínas de choque térmico como a Hsp 70 (Kantengwa *et al*, 1995) e a Hsp 100 (Hübel *et al*, 1997), foram também consideradas importantes factores de virulência.

A cultura de diversos microrganismos é acompanhada pela libertação para o meio de cultura de macromoléculas antigénicas importantes no estabelecimento de relações imunológicas e fisiológicas entre o hospedeiro e o microorganismo. Em trabalhos efectuados com *Micobacterium tuberculosis* verificou-se que as proteínas secretadas durante o seu crescimento, em cultura (Andersen *et al*. 1991), conferiam protecção a murganhos C57BL/6 comparável à protecção conferida pela BCG (Andersen, 1994). A libertação de produtos metabólicos por leishmanias, quer *in vitro* quer *in vivo*, foi demonstrada por Schnur *et al*. (1972). No entanto, Nattan-Larrier & Grimard-Richard (1933), Adler & Gunders (1964), Bray & Lainson (1966), Sergeiev & Shuikina (1969) e Cliton *et al*. (1972) tinham já mencionado a existência de

substâncias antigénicas solúveis libertadas por *L. donovani*, *L. tropica* e *L. mexicana*. Outros autores verificaram que os meios de crescimento de promastigotas contêm diversos componentes imunologicamente activos, tais como glicolípidos, hidratos de carbono e glicoproteínas (Kaneshiro *et al.* 1982, Handman *et al.*, 1984, Decker-Jackson & Honigberg 1987, King *et al.*, 1987, Bates *et al.*, 1990, Ilg *et al.*, 1991).

Os produtos libertados por *Leishmania* spp. têm vindo a ser implicados em diferentes fases do ciclo de vida do parasita, quer ao nível do vector (Schlein *et al.*, 1991, Blum & Opperdoes, 1994), quer ao nível do hospedeiro vertebrado (Mukerji *et al.*, 1986, El-On *et al.*, 1980, Londner *et al.*, 1983), podendo também funcionar como factores de virulência uma vez que parecem contribuir para a sobrevivência do parasita.

Em estudos recentes, foi descrito que uma forma activa da metaloprotease gp63 é libertada por várias espécies de *Leishmania*. Esta digere a matriz extra celular permitindo a migração dos parasitas (McGwire *et al.*, 2002, 2003). A migração através da matriz extra celular e da membrana basal pode facilitar a disseminação do parasita para locais distantes no hospedeiro (Ghosh *et al.*, 1999, Bandyopadhyay *et al.*, 2002).

#### **4. Estratégias de controlo das leishmanioses**

Para que o controlo das leishmanioses seja eficaz devem-se adoptar estratégias integradas, incluindo o hospedeiro vertebrado e o vector como elementos principais da cadeia epidemiológica. As estratégias de controlo devem incidir sobre: as características biológicas e químicas do vector; o diagnóstico e o tratamento dos hospedeiros; e a protecção individual e colectiva da população humana e canina (WHO, 1990). Outra medida de controlo de extrema importância será a vacinação, para tal a investigação nesta área deve de ser encorajada e ampliada.

#### 4.1 Controlo do vector

A aplicação de insecticidas em larga escala para o controlo do vector nem sempre é possível devido, principalmente às implicações ambientais que estes acarretam, bem como os efeitos nocivos sobre o ser humano. As resistências aos insecticidas por parte dos insectos são outro problema que foi emergindo à medida que estes foram sendo aplicados a partir de meados do século passado (Mukhopadhyay *et al*, 1996; Singh *et al*, 2001; Tetreault *et al*, 2001). Vários são os insecticidas que têm sido utilizados, onde se incluem o DDT, um dos primeiros e que foi especialmente aplicado no controlo do vector da malária (*Anopheles* sp.) na década de cinquenta, mas que foi desaconselhado em termos de saúde pública bem como em termos económicos. A permetrina e o malatión também têm sido utilizados (Tetreault *et al*, 2001). No entanto, o efeito dos insecticidas é temporário. Outras medidas aplicadas são o controlo biológico do vector, através da utilização de parasitas de alguns flebótomos (Martinez-Ortega *et al*, 1983; Pener & Vilanowsky, 1996; Pires *et al*, 1997a) e o controlo ecológico de modo a dificultar o desenvolvimento do vector (WHO, 1990).

#### 4.2 Métodos de diagnóstico das leishmanioses

O diagnóstico parasitológico, através da pesquisa do parasita ou do seu DNA nas lesões ou tecidos dos hospedeiros eventualmente infectados, é um dos métodos utilizados. O outro é o diagnóstico seroimunológico, que consiste na detecção de anticorpos anti-leishmania.

##### 4.2.1 Diagnóstico parasitológico

Os métodos clássicos deste tipo de diagnóstico consistem no exame directo ou cultura do parasita a partir de amostras biológicas, colhidas em indivíduos com suspeita clínica de leishmaniose. O material biológico é colhido em órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocítico, principalmente por biópsia da medula óssea, por constituir menor risco para o paciente que as biópsias hepáticas e esplénicas, bem como nas lesões da pele. No cão também é utilizada a punção

aspirativa dos gânglios linfáticos. O exame directo é efectuado por observação de esfregaços em lâmina, do material obtido, ao microscópio óptico após coloração com Giemsa. Apesar de se tratar de um método expedito, no caso de o número de amastigotas ser reduzido e porque muitas vezes a distribuição dos mesmos não é homogénea nos esfregaços, pode acontecer que não seja possível detectar o parasita, mesmo com uma observação cuidada (Harith *et al*, 1987).

O exame cultural aumenta a probabilidade de sucesso do diagnóstico, mas a resposta é demorada, podendo, no caso de inóculos escassos em parasitas, chegar a cinco semanas. Podem, ainda, ocorrer contaminações das culturas por fungos ou bactérias. No entanto, o isolamento da estirpe facilita a sua identificação, dado que as espécies de *Leishmania* são morfologicamente indistintas.

As técnicas de detecção de ácidos nucleicos do parasita no diagnóstico da leishmaniose têm-se desenvolvido e a sua utilização tem vindo a aumentar nas últimas décadas (Meredith *et al*, 1993). A reacção em cadeia da polimerase (PCR), a mais utilizada, consiste na amplificação do DNA do parasita pelo uso de sequências iniciadoras ou “primers” específicos, a partir de uma amostra biológica, nomeadamente medula óssea, tecido cutâneo, esplénico e hepático, gânglio linfático, líquido pleural e sangue periférico (Smith *et al*, 1992; Nuzum *et al*, 1995; Andresen *et al*, 1997; Osman *et al*, 1998; Campino *et al*, 2000a; Cortes *et al*, 2004). Apesar de permitir uma identificação rápida, uma das desvantagens desta técnica é o de poder detectar parasitas não viáveis e não necessariamente infecções activas (Delgado *et al*, 1996).

#### 4.2.2 Diagnóstico seroimunológico

A detecção de anticorpos específicos é muito importante no diagnóstico de LV, principalmente em indivíduos imunocompetentes.

O método universalmente utilizado no diagnóstico seroimunológico da leishmaniose visceral é a imunofluorescência indirecta (Oddo & Cascio, 1963) devido à sua elevada sensibilidade e especificidade (Dunan *et al*, 1987). Esta técnica semi-quantitativa permite também seguir a infecção, discriminando a fase aguda duma fase de remissão após uma terapêutica bem sucedida, por detecção da diminuição de anticorpos circulantes (Millesimo *et al*, 1996).

Em 1973, foi desenvolvida a técnica de contraimuno-electroforese que, apesar de não ser quantitativa, apresenta uma elevada sensibilidade (83,3%) e especificidade (96,3%), e utiliza quantidades mínimas de antígeno, obtendo-se o resultado num curto espaço de tempo (Barbosa *et al*, 1973; Dunan *et al*, 1987; Campino, 1991).

Mais tarde, a partir da técnica de “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) (Engvall & Perlmann, 1972) desenvolveu-se a micro-ELISA que permite a análise simultânea de um número muito elevado de amostras (Hommel *et al*, 1978), com elevada sensibilidade (100%) e especificidade (90,5%) (Maurício *et al*, 1995). No entanto, a instabilidade dos reagentes, o facto de apresentar uma reprodutibilidade pouco satisfatória e de não permitir distinguir entre a fase aguda e a fase remissiva da doença (Millesimo *et al*, 1996) torna-a pouco adequada ao diagnóstico, mas bastante útil nos estudos epidemiológicos, que normalmente consistem na análise de um elevado número de suspeitos.

Harith *et al* (1986, 1987, 1989), desenvolveram um teste de aglutinação directa (DAT) com reagentes estáveis, que também pode ser utilizada em grande escala e que apresenta resultados de fácil leitura e interpretação. As limitações deste método relacionam-se com o antígeno utilizado, o qual apresenta variabilidade entre diferentes lotes e custos elevados. Uma outra desvantagem da técnica de DAT é não permitir uma boa distinção entre indivíduos saudáveis e indivíduos em fase de remissão (Millesimo *et al*, 1996).

Todas estas técnicas apresentam elevadas sensibilidades quando aplicadas a soros de indivíduos imunocompetentes com LV. No entanto, em indivíduos imunocomprometidos que apresentam uma resposta humoral reduzida ou mesmo ausência de anticorpos circulantes, estas técnicas revelaram-se pouco sensíveis (Rosenthal *et al*, 1995; Santos-Gomes *et al*, 1998). Assim, nos anos 90 foi aplicada a técnica de Western-blot no diagnóstico da LV em doentes imunocomprometidos, a qual demonstrou uma elevada sensibilidade (100%) e especificidade (73,3%), embora não haja consenso em relação ao padrão de antígenos de diferentes massas moleculares reconhecidos pelos anticorpos produzidos durante a infecção (Mary *et al*, 1992; Rolland *et al*, 1994; Marty *et al*, 1995; Costa *et al*, 1996; Santos-Gomes *et al*, 2000b).

A conjugação de pelo menos duas técnicas seroimunológicas e a detecção precoce do parasita, permite uma maior segurança no diagnóstico de LV em indivíduos imunocomprometidos (Kagan, 1979; Davies *et al*, 2003).

### 4.3 Tratamento das leishmanioses

Antes de se iniciar o tratamento, o estado de saúde do hospedeiro tem que ser avaliado de modo a que a terapêutica instituída tenha um resultado aceitável. O factor económico e o modo de administração dos fármacos também são factores importantes, tanto nos humanos, que requer internamento hospitalar, como nos cães, onde o tempo e a dedicação que o tratamento exige tem que ser bem considerados pelos proprietários dos animais.

No tratamento da leishmaniose são utilizados, há mais de cinquenta anos, derivados antimoniais pentavalentes, especialmente o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®). Apesar de a aplicação destes fármacos em humanos ser em geral bem sucedida, têm surgido relatos de resistência medicamentosa (Serenio *et al*, 2001; Sundar, 2001). No caso da leishmaniose canina, também o alopurinol (Zyloric®), que causa a paragem da biosíntese do ácido nucleico do parasita (Steuber *et al.*, 1999) e a aminosidina (Amminofarma®), um antibiótico de largo espectro que se liga à sub-unidade ribossomal mais pequena, inibindo a síntese proteica (Fong *et al.*, 1994, Maarouf *et al.*, 1997), são utilizados.

A Trifluralina, um herbicida, dinitroanilina, que se liga à tubulina de *Leishmania* inibindo a proliferação de promastigotas e reduzindo a infectividade dos amastigotas, tem sido utilizada em estudos experimentais (Chan *et al.*, 1995).

Após dois anos de aplicação de medidas de controlo e terapêutica de cães infectados com antimoniais, um estudo em Itália revelou que a prevalência da leishmaniose canina foi reduzida em cerca de dois terços (Gradoni *et al*, 1988). No entanto, na maioria dos casos o tratamento dos cães não resulta, sendo frequentes as recrudescências, especialmente em animais com infecções sintomáticas (Mancianti *et al*, 1988; Alvar *et al*, 1994).

Raramente se tem utilizado a imunoterapia, nomeadamente com IL-12 e IFN $\gamma$ . No entanto um estudo divulgou que a utilização da quimioterapia antimonial seguida de imunoterapia, aplicada em oito cães com leishmaniose, causou a eliminação completa de parasitas do organismo do hospedeiro (Neogy *et al*, 1994).

É urgente o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes, menos tóxicos, e de administração oral, cuja duração da aplicação seja encurtada e que actuem de modo sinérgico para aumentar o seu limite de actividade (Olliaro & Bryceson, 1993).

Os cães assintomáticos constituem um bom reservatório da doença, constituindo uma fonte de infecção para os flebótomos (Killick-Kendrick *et al*, 1994; Molina *et al*, 1994) pelo que o abate dos cães sintomáticos como medida de controlo do reservatório doméstico não é eficaz, como se verificou no Brasil (Dietze *et al*, 1997) e na China (Zhi-Biao *et al*, 1984). O ideal seria o rastreio serológico obrigatório dos cães com o objectivo de detectar os animais infectados assintomáticos. Contudo, há que lembrar que o ciclo silvático se mantém activo, pois o tratamento e a eliminação destes reservatórios é impraticável.

#### 4.4 Profilaxia

O uso de coleiras repelentes e de sprays insecticidas de aplicação tópica tem contribuído para a diminuição da taxa de picada dos flebótomos na população canina. Num estudo experimental, onde se aplicou um spray repelente (Dowin<sup>®</sup>) a cães, verificou-se que as fêmeas de *Ph. perniciosus* se recusavam a efectuar a sua refeição sanguínea e que o efeito do repelente se manteve ao longo das três semanas de ensaios (Asher *et al*, 1997; Pires *et al*, 1997b; Pires 2000).

Actualmente encontram-se comercializadas coleiras de plástico impregnadas com o piretroide deltametrina, que protegem os cães de 96% das picadas dos flebótomos, mantendo-se activas durante 34 semanas (Killick-Kendrick *et al*, 1997).

Tendo em vista a importância desta zoonose na saúde pública torna-se necessária uma nova estratégia de controlo. O desenvolvimento de uma vacina anti-*Leishmania* será sem dúvida a estratégia de controlo de eleição, nomeadamente no caso da leishmaniose canina, uma vez que se admite que a prevenção da doença no cão é a forma mais eficaz para a interrupção do ciclo doméstico (Tesh, 1995).



O estudo da eficácia de produtos candidatos a vacina é dificultado pela susceptibilidade ou resistência apresentada por cada animal (Cabral *et al*, 1992; Pinelli *et al*, 1994).

Vários têm sido os testes de vacinas, tanto para a leishmaniose visceral como para a leishmaniose cutânea. Estes estudos incluem a utilização de uma extensa variedade de preparações candidatas a vacinas (parasitas atenuadas, parasitas mortos, antígenos totais, fracções antigénicas).

Num trabalho, onde se utilizou a gp63, o LPG e a fracção carbohidrato da membrana celular de *L. major*, para vacinar cães que foram posteriormente infectados com promastigotas de *L. infantum*, verificou-se que 60% dos cães vacinados se infectaram enquanto que apenas 20% dos cães não vacinados adquiriram a infecção, revelando uma exacerbação da doença provocada pela vacinação (Nieto *et al*, 1991). Noutro estudo, foram inoculados 31 cães com *L. brasiliensis* e BCG, ou apenas BCG, e infectados posteriormente com *L. chagasi*. A vacina não produziu efeitos adversos nos cães inoculados tendo sido demonstrado o seu poder imunogénico pela protecção, ainda que parcial, dos cães (Mayrink *et al*, 1996).

Os testes de outro produto candidato a vacina, utilizando antígeno de *L. donovani* revelaram que nos cães vacinados, os títulos de anticorpos se mantinham dez dias após a administração da primeira dose e que estabilizavam após a segunda dose (Borja-Cabrera *et al*, 1997).

Recentemente, o efeito potencial duma vacina utilizando o ligando da fucosemanose (FML) em murganhos BALB/c, apresentou excelentes resultados com redução da carga parasitária e dos sinais clínicos da infecção (Santos *et al*, 2003). O FML foi estudado pelo mesmo grupo em cães, tendo revelado ser eficaz na imunoterapia da leishmaniose visceral. Foram observadas proporções normais de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD21 em cães vacinados, sugerindo a sua condição não infecciosa, assim como, todos os animais apresentaram um aumento dos linfócitos CD8<sup>+</sup> conforme se espera em tratamentos vacinais efectuados com o adjuvante saponina de *Quillaja* (QuilA) (Borja-Cabrera *et al*, 2004).

Nos últimos anos os trabalhos experimentais com vacinas de DNA têm conhecido um crescente interesse por parte de vários investigadores (Watts & Kennedy, 1999), ainda que haja elevada controvérsia relativamente à aplicação deste tipo de vacina.

## **CAPÍTULO II. MATERIAL E MÉTODOS**

## CAPÍTULO II

Este capítulo inicia-se com a descrição do modelo animal, dos parasitas e dos antigénios utilizados, tendo sido posteriormente estruturado de acordo com os objectivos do trabalho, pondo em evidência a sequência das experiências realizadas:

- Avaliação da resposta linfocitária e cinética de produção e expressão de citocinas em leucócitos do baço de duas estirpes de murganhos infectados com *L. infantum*, estimulados “*in vitro*” por fracções proteicas libertadas por promastigotas;
- Avaliação da resposta das subpopulações linfocitárias T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do baço de duas estirpes de murganhos infectados com *L. infantum*, quando estimuladas pelas fracções proteicas libertadas por promastigotas;
- Ensaio de imunização de murganhos BALB/c com as fracções proteicas libertadas por *L. infantum* que revelaram induzir uma resposta imunológica protectora “*in vitro*”.

Os métodos estatísticos utilizados na análise dos resultados são descritos no último ponto deste capítulo.

## 1. Animais, parasitas e antígenos

Neste estudo foram utilizados murganhos (*Mus musculus*) fêmeas com cinco a seis semanas de idade, pertencentes a duas estirpes:

- C57BL/6 (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Espanha), com fenótipo de maior resistência à infecção por *Leishmania*;
- BALB/c (Harlan Interfauna Ibérica), com fenótipo de maior sensibilidade à infecção por *Leishmania*.

Para a manutenção da virulência da estirpe de *Leishmania* utilizada neste estudo, foi também necessário recorrer a hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) que foram adquiridos ao biotério do IHMT.

Os animais foram mantidos no Biotério do IHMT em condições climáticas e de nutrição adequadas e de acordo com as normas comunitárias (86/609/CEE) relativas ao bem-estar dos animais de experiência transpostas para a lei nacional (D.R. DL129/92 e portaria 1005/92).

Nas experiências de infecção de murganhos, na preparação de antígeno e na obtenção das fracções proteicas libertadas pelos promastigotas foi utilizada a estirpe *L. infantum* (MCAN/PT/94/IMT 205) zimodemo MON-1.

### 1.1 Obtenção de promastigotas virulentos de *L. infantum*

A estirpe *L. infantum* MON-1 manteve-se infectante por passagens sucessivas em hamsters. Os parasitas foram isolados em cultura em meio de NNN (Novy-Nicolle-McNeal) a +24°C, a partir de macerado de fígado ou baço de hamsters infectados. De forma a obter um número elevado de formas promastigotas, necessário à infecção dos murganhos, os parasitas foram transferidos para meio líquido de alto rendimento como o RPMI [RPMI 1640 (Biochrom, Berlim, Alemanha), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml] suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino (FCS; Biochrom), previamente inactivado pelo calor (30 minutos a +56 °C). Vários estudos têm demonstrado que é no início da fase estacionária de crescimento que os promastigotas são mais virulentos (Grimm *et al*, 1991; Bates, 1994; Courret *et al*, 1999). De modo a definir as fases logarítmica e estacionária de crescimento em meio RPMI, FCS 20%, foi determinada a curva de crescimento dos promastigotas

através da contagem do número de parasitas/ml ao longo de cinco dias de cultura, em hemacitômetro do tipo Neubauer, por microscopia óptica. No entanto, só foram utilizados promastigotas provenientes de culturas com menos de cinco subculturas para serem inoculados nos animais, uma vez que em estudos anteriores ficou demonstrado que os promastigotas de *L. infantum* deixam de ter capacidade infectante após esse período (Santos-Gomes & Abranches, 1996). Para o isolamento das frações proteicas libertadas foram utilizados promastigotas provenientes de culturas com três subculturas. Na preparação do antígeno solúvel (Ag) foram utilizados promastigotas obtidos a partir de culturas de *L. infantum* MON-1 em meio RPMI, FCS 20%, com mais de cinco subculturas *in vitro*. Os parasitas foram recolhidos da fase estacionária da curva de crescimento, de forma a obter o número máximo de promastigotas. A contagem de parasitas foi efectuada em câmara de Neubauer, por microscopia óptica.

## **1.2 Preparação de antígeno solúvel de *L. infantum***

O Ag foi preparado a partir de promastigotas numa concentração de  $10^8$  parasitas/ml. Os promastigotas foram lavados com tampão fosfato salino (PBS; BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) EDTA 2 mM, a 925 g durante 15 minutos a  $+4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi rejeitado e ao sedimento foi adicionado 500  $\mu\text{l}$  de água destilada. Foi de seguida iniciado o processo de lise celular através de seis ciclos de congelação e descongelação ( $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-70^{\circ}\text{C}$ , temperatura ambiente), ao qual se seguiu uma centrifugação a 925 g com recolha de sobrenadante.

A concentração proteica foi determinada por espectrofotometria (Gene Quant II; Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) utilizando a fórmula:

$$1,55 \times A_{280 \text{ nm}} - 0,77 \times A_{260 \text{ nm}} = \text{mg/ml},$$

em que A representa Absorvância.

O Ag foi conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até à sua utilização.

### 1.3 Obtenção dos sobrenadantes de culturas de promastigotas de *L. infantum*

Os promastigotas virulentos obtidos em cultura a partir do baço e do fígado de Hamsters infectados foram posteriormente transferidos para meio livre de proteínas (RPMI) onde se mantiveram durante 24 horas, a 24°C. Recolheram-se os sobrenadantes que foram concentrados duas vezes por centrifugação, utilizando tubos “Centricons” (Amicom, Millipore, USA), a 4000 g durante 20 min. Para recolher o concentrado localizado nas membranas, procedeu-se a uma nova centrifugação a 1000 g durante 1 min., invertendo-se o tubo e colocando um receptor apropriado. Cada “Centricon” não foi utilizado mais do que três vezes, para que a sua eficiência não fosse afectada.

### 1.4 Isolamento de fracções proteicas libertadas por *L. infantum*.

Os sobrenadantes concentrados obtidos a partir das culturas de promastigotas foram sujeitos a electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes por adição de dodecil sulfato de sódio (SDS; BDH, Poole, Reino Unido) (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

#### 1.4.1 SDS-PAGE – Separação das fracções proteicas

Preparou-se um gel de poliacrilamida a 10% [2,5 ml acrilamida (BDH) a 40%; 3,73 ml de tris base HCL 1,5 M, pH 8,8; 3,76 ml de H<sub>2</sub>O ultra-pura; 100 µl de SDS; 33,3 µl de uma solução de persulfato de amónia (APS) a 10%; 6,66 µl de solução de tetrametil-etilenodiamina (Temed, GibcoBRL)] e deixou-se polimerizar entre as placas de vidro de um sistema mini gel (BioRAD, Milano, Italy). Adicionou-se um gel de poliacrilamida a 5% (2,5 ml acrilamida a 40%; 1,25 ml de tris base HCL 1,5 M, pH 6,8; 7,42 ml de H<sub>2</sub>O ultra-pura; 100 µl de SDS; 50 µl de APS a 10%; 10 µl de Temed), colocou-se um pente e deixou-se polimerizar. Retirou-se o pente e colocou-se o gel dentro da uma tina, cobrindo-o com tampão tris-glicina-SDS [3,3 g de tris base HCL, pH 8,3; 14,4 g de glicina (Merck, Darmstadt, Germany); 1 g de SDS]. Colocou-se o sobrenadante concentrado das culturas de promastigotas, o

sobrenadante não concentrado, o meio utilizado e os marcadores de massa molecular (BioRAD). Fez-se passar pelo sistema uma corrente eléctrica de 120 V (E.C. 575, E-C Apparatus Corporation, Florida, USA).

#### 1.4.2 Electroeluição – Isolamento das fracções proteicas

As fracções antigénicas separadas por SDS-PAGE foram isoladas utilizando o “MiniElectroelutor” (Bio-RAD).

Antes de montar o sistema de eluição, embeberam-se três pedaços de papel de filtro pequenos, um pedaço maior e uma folha de celofane, que já vêm cortados e preparados do fabricante (Bio-RAD), no tampão de eluição (tris-glicina-SDS [3,3 g de tris base HCL, pH 8,3; 14,4 g de glicina (Merck); 1 g de SDS]). Depois do suporte metálico colocou-se o celofane, para isolar bem o sistema e em seguida o quadrado de papel de filtro maior. Colocou-se a câmara de eluição, preenchendo as ranhuras com o tampão de eluição. Por cima da câmara depositou-se o gel com as fracções proteicas. Finalmente, colocaram-se três pedaços mais pequenos de papel de filtro, que têm como função manter o sistema húmido. Apertaram-se os parafusos e colocaram-se umas etiquetas apropriadas a tapar os orifícios de colheita. A eluição realizou-se a 100 mA durante 30 minutos. A optimização do tempo de transferência das fracções proteicas do gel de SDS para o tampão de electroeluição foi efectuada através de vários ensaios com 20, 25, 30, 35 e 40 minutos de tempo de transferência. A melhor eficiência na eluição das proteínas foi obtida com 30 minutos de transferência

As fracções proteicas foram recolhidas em três grupos com diferentes massas moleculares (<37 kDa – grupo Low, 37-75 kDa – grupo Inter e > 75 kDa – grupo High).

No final corou-se o gel com azul de Comassie, durante 20 a 30 minutos, para confirmar a eluição total das fracções proteicas.

Os extractos eluidos foram concentrados por centrifugação, utilizando tubos “Centricons” (Amicom, Millipore), como descrito em 1.3.

Em seguida, procedeu-se à quantificação proteica.



Com o objectivo de melhorar a visualização das fracções proteicas com baixo peso molecular no gel, procedeu-se alternativamente a uma coloração com nitrato de prata (Blum *et al*, 1987).

#### 1.4.3 Coloração por nitrato de prata

Em primeiro lugar procedeu-se à fixação do gel com uma solução de 50% de metanol (Sigma), 12% de ácido acético (Sigma) e 0,05% de formaldeído (37-40%, Sigma), durante 40 minutos. Efectuaram-se três lavagens, de 10 minutos cada, com uma solução de etanol a 50%. Mergulhou-se o gel numa solução de pré-tratamento [1ml de solução stock em 100 ml de água bidestilada; solução stock (200mg tiosulfato de sódio (Sigma) em 10 ml de água bidestilada)] durante um minuto. De seguida foram realizadas três lavagens com água bidestilada de 20 segundos cada. A coloração do gel foi então efectuada (200 mg de nitrato de prata (Sigma), 0,75 µl de formaldeído em 100 ml de água bidestilada) durante 20 minutos. Seguiram-se mais três lavagens com água bidestilada, de 20 segundos cada. O gel foi então mergulhado numa solução corante [6 g de citrato de sódio (Sigma), 50 µl de formaldeído e 20 µl de tiosulfato de sódio (Sigma) em 100ml de água bidestilada], durante o tempo necessário para permitir uma boa visualização das fracções proteicas. Efectuaram-se mais duas lavagens com água bidestilada durante dois minutos e parou-se a reacção colocando o gel numa solução de 50% metanol e 12 % ácido acético durante cinco minutos. Finalmente, procedeu-se a uma lavagem com uma solução de metanol a 50% durante 20 minutos. Todos os passos descritos foram realizados à temperatura ambiente e com agitação permanente. No final do processo transferiu-se o gel para um recipiente com água e deixou-se a fixar durante 8h.

#### 1.4.4 Quantificação proteica – Método de Lowry

A concentração proteica foi determinada utilizando uma adaptação ao método de Lowry. Nesta técnica foram utilizadas as soluções A, B e S (Bio-RAD), uma solução de albumina com 1,4 mg/ml (Bio-RAD), a partir da qual foram efectuadas várias diluições de modo a obter concentrações proteicas diferentes para a construção da

curva padrão com várias se concentrações (0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,7 mg/ml, 1,0 mg/ml e 1,25 mg/ml) Preparou-se uma solução A' (1000 µl de solução A : 20 µl de solução S, Bio-RAD). Colocaram-se 21,7 µl da amostra ou água nos tubos correspondentes, em triplicado para cada um respectivamente. Juntaram-se 108,3 µl da solução A' a cada tubo e agitou-se vortex. Adicionaram-se 870 µl da solução B e agitou-se novamente. Após 15 min. leu-se a absorvância num comprimento de onda de 715 nm, num espectofotómetro.

Os três grupos de fracções proteicas foram conservados a -20°C até à sua utilização.

#### 1.4.5 “Immunoblot”

Esta técnica foi introduzida no estudo com o objectivo de comprovar se as fracções proteicas isoladas dos meios de cultura eram reconhecidas por anticorpos anti-*Leishmania*.

Uma membrana de nitrocelulose (Gelman Sciences, Ann Arbor, USA) e seis rectângulos de papel de filtro “Watman” nº3 de igual tamanho foram submersos em tampão de transferência tris-glicina (2,42g de tris base HCl; 11,75g de glicina) durante 30 minutos em agitação, à temperatura ambiente. Ao fim deste tempo colocou-se o gel em contacto com a membrana de nitrocelulose cobrindo ambos com o papel de filtro. A transferência das proteínas antigénicas efectuou-se num Fast Blot B33 (Biometra, Göttingen, Alemanha), aplicando uma corrente de 445 mA durante 45 minutos. Na membrana de nitrocelulose foram visualizados os antígenios e os marcadores por meio de uma coloração de três minutos de duração, com Ponceau S (BDH) e cortou-se a membrana de nitrocelulose em tiras. Bloquearam-se as ligações inespecíficas dos antígenios por imersão da membrana em TBS com 3% de BSA (Albumina de soro bovino; Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha) durante 60 minutos à temperatura ambiente em agitação. Retirou-se a membrana e lavou-se três vezes em 0,1% (v/v) Tween 20 em TBS (TBS/Tween 20), durante 15 minutos.

Incubaram-se as tiras de nitrocelulose com as fracções proteicas com soros de cães com leishmaniose canina, diluídos a 1:50 em TBS/BSA, durante 60 minutos à temperatura ambiente e em agitação. Rejeitaram-se os soros e procedeu-se à

lavagem das tiras com TBS/Tween 20. Adicionou-se o conjugado anti-IgG de cão, marcado com fosfatase alcalina (Sigma), diluído a 1:1000 em TBS/BSA e incubou-se durante 60 minutos à temperatura ambiente em agitação. Após lavagem, mergulharam-se as tiras no substrato da fosfatase alcalina [0,04 mM 5-bromo-4-chloro-3-indol fosfato, (Sigma); 0,37 mM azul de tetrazolio (Sigma); 10 mM NaCl; 10 mM tris base HCl; 0,25 mM MgCl<sub>2</sub>] até ao aparecimento das bandas. Bloqueou-se a reacção por imersão das tiras em água bidestilada.

O cálculo da massa molecular das fracções antigénicas reconhecidas efectuou-se através de uma curva de calibração que foi determinada a partir dos marcadores de massa molecular.

## **2. Análise da actividade imunogénica das fracções proteicas libertadas por *L. infantum* (*in vitro*)**

As proteínas libertadas por *L. infantum*, *in vivo*, possuem um papel ainda muito pouco conhecido principalmente no que respeita à modulação da resposta imunológica do hospedeiro. Através da análise de vários parâmetros parasitológicos e imunológicos procurou-se contribuir para o esclarecimento deste assunto estabelecendo interligações entre a dinâmica dos diferentes parâmetros e obtendo uma visão integrada do processo.

Para tal, a cinética de produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-12, foi analisada em células mononucleares leucocitárias do baço. Foi também aplicada a técnica de PCR em tempo real (“Real-Time” PCR) para determinação dos níveis de expressão de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-12 no baço.

## **2.1 Infecção experimental**

Para cada estirpe de murganhos, C57BL/6 e BALB/c, foram definidos dois grupos: controlo e infectado. O grupo infectado foi inoculado via intraperitoneal com  $5 \times 10^6$  promastigotas virulentos de *L. infantum*.

## **2.2 Recolha de material biológico**

Após 30 e 45 dias de infecção dos murganhos, amostras biológicas foram obtidas de dois animais de cada grupo (controlo e infectado).

Os animais foram sacrificados por secção da cervical e o baço recolhido para determinação da carga parasitária e isolamento de células mononucleares leucocitárias.

## **2.3 Determinação da carga parasitária no baço**

A carga parasitária encontrada no baço dos animais experimentalmente infectados contribui para definir a dinâmica da parasitose e o grau de susceptibilidade/resistência à infecção (Honoré *et al*, 1998).

O exame parasitológico que permite obter uma estimativa do número de parasitas viáveis presentes num órgão é o método da diluição limite. Este método baseia-se na realização de diluições sucessivas de homogeneizado do órgão em estudo e após cultura, na detecção de formas promastigotas por observação em microscópio óptico. A diluição mais elevada em que se visualize pelo menos um promastigota é considerada a diluição limite e usada no cálculo da carga parasitária. A técnica utilizada é adaptada de Buffet *et al* (1995).

Um fragmento com 0.01 g de baço foi homogeneizado em 4 ml de meio de RPMI FCS 20 %. Numa placa de 96 poços de fundo em U (Nunc), com 50 µl de fase sólida de meio NNN por poço, foram adicionados 75 µl de meio RPMI 20% FCS, excepto no primeiro poço de cada coluna. Do homogeneizado do órgão foram retirados 125 µl e inoculados no primeiro poço de cada coluna da microplaca tendo-se efectuado diluições geométricas de 1:4 para os poços seguintes até à diluição de 1:16384. Para cada amostra de órgão foram efectuadas duas réplicas. Após 15 dias

de incubação a +24°C, foi retirado 10 µl de cada diluição e observado em microscópio óptico. A presença de promastigotas foi registada. O número de parasitas viáveis por grama de órgão foi calculado com base na seguinte fórmula:

$$\frac{\text{recíproco do título da maior diluição com presença de promastigotas}}{\text{peso do fragmento do órgão usado (mg)}} \times 400$$

A carga parasitária foi expressa em nº parasitas viáveis/mg de órgão.

## 2.4 Isolamento e quantificação de leucócitos mononucleares

As células mononucleares isoladas do baço dos murganhos foram utilizadas na caracterização da resposta imunológica, induzida pelos três grupos de fracções proteicas, através da análise da proliferação linfocitária, bem como da cinética da produção e expressão de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e inflamatórias.

Os baços de dois animais foram macerados e homogeneizados em meio RPMI, e de seguida a suspensão celular foi centrifugada a 370 g durante 10 minutos a +4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi eliminado e o sedimento ressuspendido em RPMI, seguindo-se o isolamento de células mononucleares leucocitárias por gradiente de densidade. A suspensão celular foi colocada cuidadosamente sobre o meio de separação de linfócitos (Ficol; GibcoBRL) numa proporção de 2 ml suspensão celular para 4 ml de Ficol, e centrifugada a 520 g, durante 25 minutos à temperatura ambiente. Este meio de separação de linfócitos (Ficol) tem densidade inferior à dos eritrócitos e granulócitos e superior à dos linfócitos. Assim, após centrifugação, ficam retidos no sedimento os eritrócitos e células polimorfonucleares, enquanto que na interface entre o meio RPMI e o Ficol fica um anel celular, enriquecido em linfócitos. Este anel foi cuidadosamente recolhido e submetido a três lavagens com solução de Hanks, a 370 g durante 10 minutos a +4°C. O sedimento foi ressuspendido em meio RPMI 10% FCS. A viabilidade celular foi determinada por coloração das células com azul de Tripan. A contagem de células viáveis realizou-se em câmara de Neubauer por microscopia óptica.

## **2.5 Cultura de leucócitos mononucleares - Proliferação Linfocitária**

Em cada poço de uma placa de 96 poços de fundo em U (Nunc), foram colocadas  $3 \times 10^5$  células leucocitárias viáveis, em 150  $\mu$ l de meio RPMI 10% FCS. Simultaneamente, foram adicionados 50  $\mu$ l de Ag (10  $\mu$ g/ml) e 50  $\mu$ l de cada uma das fracções proteicas (5  $\mu$ g/ml), designando-se as amostras, respectivamente, como células estimuladas com Ag e células estimuladas com as fracções proteicas High, Inter e Low. Como controlo, foram ainda adicionados em outros poços, 50  $\mu$ l de meio RPMI FCS 10% a células que se designaram por não-estimuladas (WS). Para cada amostra foram efectuadas três réplicas. As células foram mantidas em cultura durante cerca de 72 horas a +37°C, 5% CO<sub>2</sub> em atmosfera húmida. Em seguida as células foram incubadas com 1  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-metiltimidina (Amersham Life Sciences, U.K.) durante 14-16 horas, após as quais procedeu-se à sua colheita, utilizando um colector de células (PHD™ Cell Harvester, Cambridge Technology, Inc., UK). A radioactividade incorporada foi medida num “ $\beta$ -counter” (Beckman LS 6500, Germany) e expressa em cintilações por minuto (cpm). O índice de estimulação (SI) foi calculado pela razão entre o valor médio de cpm das células estimuladas e o valor médio de cpm das células não estimuladas. Culturas paralelas foram mantidas durante 72 horas a 37°C 5% CO<sub>2</sub> em atmosfera húmida. Os sobrenadantes foram, então, colhidos com o objectivo de quantificar a produção de citocinas, enquanto que as células foram utilizadas para posterior extracção de RNA e análise da expressão das mesmas citocinas.

## **2.6 Quantificação relativa por PCR em tempo real de mRNA de IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10**

O PCR em tempo real consiste numa técnica inovadora e com grandes potencialidades na quantificação absoluta ou relativa da expressão génica (Holland *et al*, 1991; Higuchi *et al*, 1992). Permite a quantificação do produto de PCR durante a fase exponencial da reacção e a monitorização em tempo real da reacção de amplificação. Com esta metodologia efectuam-se ensaios moleculares e biológicos funcionalmente fiáveis, sensíveis e reprodutíveis.

O RNA mensageiro (mRNA) das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 foi quantificado nas células mononucleares leucocitárias do baço usando o método de quantificação relativa. Este tipo de quantificação, em tempo real, elimina diferenças inerentes à fase estacionária de amplificação, durante a qual os componentes da reacção se tornam limitantes para a amplificação do produto. Por esta razão o valor de Ct (“cycle threshold”), que corresponde ao ciclo em que se inicia a fase exponencial da amplificação da reacção de PCR, é a medida mais fiável da quantidade inicial de DNA complementar (cDNA). O método utiliza fórmulas matemáticas que permitem calcular a quantidade do gene-alvo amplificado face à expressão de um gene “normalizador”. O gene normalizador ideal é um gene “housekeeping”, isto é, um gene que é expresso constitutivamente, a um nível constante e em todos os tecidos de um organismo. O gene HPRT (“hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase”) obedece a estas características pelo que foi usado como controlo endógeno neste estudo, tendo apresentado eficiências de amplificação semelhantes aos genes alvo.

Para a quantificação foram utilizados padrões de cDNA plasmidial para cada citocina e para o HPRT. A partir dos clones dos plasmídios obtidos para cada citocina, fizeram-se diluições seriadas de 10 e/ou cinco vezes de modo a construir uma curva padrão para cada reacção de PCR. As diluições variaram de 10 a 0.0001pg.

A expressão de mRNA de IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 foi normalizada relativamente à expressão do HPRT e foi apresentada em número de cópias de cada citocina por 1000 cópias de HPRT. O número de cópias foi calculado pela fórmula:

$$\text{Nº de cópias de mRNA} = \frac{9,1 \times 10^{11} \times \text{quantidade da citocina em } \mu\text{g}}{(3015 + \text{comprimento em pares de bases do produto amplificado}) / 1000}$$

Onde  $9,1 \times 10^{11}$  representa 1 $\mu$ g de 1000 pares de bases de DNA e 3015 é o número de pares de bases do plasmídio utilizado na clonagem.

### 2.6.1 Extracção de RNA e transcrição reversa

O RNA total foi extraído de 3 a 5 x 10<sup>5</sup> leucócitos mononucleares do baço estimulados com antígeno de *Leishmania*, com as fracções proteicas e não estimulados, previamente armazenados a -70° C em tampão de lise [0,5 ml GITC (guanidina isotiocianato; Qiagen, Hilden, Alemanha), mercaptoetanol 1% (v/v)]. As amostras foram homogeneizadas durante 1 minuto, em etanol 70% (v/v) tratado com DEPC 0,1% (dietilpirocarbonato; Sigma) de forma a evitar a degradação do RNA pelas ribonucleases (RNases).

A extração de RNA total das amostras foi realizada de acordo com as instruções do teste rápido comercial de extracção (RNeasy Mini Kit; Qiagen). Resumidamente, o lisado celular foi adicionado à coluna de purificação, recolhido e centrifugado durante 15 segundos a 8000 g à temperatura ambiente. Seguiu-se um tratamento final com desoxirribonuclease (DNase) para a remoção completa de DNA contaminante. As amostras de RNA total foram armazenadas a -70° C. Não foi efectuada a quantificação do RNA total extraído, dado que a expressão génica foi sempre normalizada em relação ao gene HPRT.

O RNA foi transformado por transcrição reversa (RT) em cDNA, usando 16,5 µl de RNA da amostra na presença de 200 U da enzima transcriptase reversa (M-MLVRT - “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase”; GibcoBRL, Gaithersburg, EUA) em tampão da reacção, a 37°C durante 60 minutos. O tampão da reacção foi constituído por: 1 mM dNTPs (GibcoBRL), 10X Oligo (dT)<sub>15</sub> (Promega, Madison, EUA), 10 mM BSA (Boehringer) e 40 U RNAsin (Promega) em tampão 3 mM “First-Strand Buffer” 5X (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>; GibcoBRL). As amostras foram aquecidas a +95°C, durante 10 minutos, para a inactivação da enzima transcriptase reversa e arrefecidas para +4°C. Em cada série de reacções, uma amostra de RNA sem adição da enzima transcriptase reversa foi utilizada como controlo negativo (reacção RT -).



### 2.6.2 Ensaio de “Real-time” PCR

Os “primers” (sequências iniciadoras) específicos, “forward” (sequência a jusante da região a estudar) e “reverse” (sequência a montante da região a estudar) para os genes das citocinas e para o gene HPRT encontram-se descritos na tabela 3.

**Tabela 3.** Genes-alvo analisados e sequências dos “primers forward” e “primers reverse”

| Genes alvo    | Sequência |                                 | Comprimento<br>(pares de bases) |
|---------------|-----------|---------------------------------|---------------------------------|
| HPRT          | FORWARD   | 5' GCTCGAGATGTCATGAAGGAGAT-3'   | 91                              |
|               | REVERSE   | 5' CCAGCAGGTCAGCAAAGAACT-3'     |                                 |
| IFN- $\gamma$ | FORWARD   | 5' CAATGAACGCTACACACTGCATC-3'   | 72                              |
|               | REVERSE   | 5' CGTGGCAGTAACAGCCAGAA-3'      |                                 |
| IL-4          | FORWARD   | 5' GACGCCATGCACGGAGAT-3'        | 81                              |
|               | REVERSE   | 5' GCCCTACAGACGAGCTCACTCT-3'    |                                 |
| IL-10         | FORWARD   | 5' CAAGGCAGCCTTGCAGAAA-3'       | 71                              |
|               | REVERSE:  | 5' CAGTAAGAGCAGGCAGCATAGC-3'    |                                 |
| IL-12         | FORWARD   | 5' AGACCCTGCCCATTGAACTG -3'     | 73                              |
|               | REVERSE:  | 5' AAGAAGCTGGTGCTGTAGTTCTCA -3' |                                 |

As amplificações de PCR foram efectuadas usando o SYBR<sup>®</sup> Green, como fluorocromo específico para cadeias duplas de DNA com contínua monitorização da emissão de fluorescência.

A amplificação foi realizada num volume total de 20  $\mu$ l, contendo: 2  $\mu$ l de amostra de cDNA, 10  $\mu$ l de 2X SYBR<sup>®</sup> Green I dye PCR Master (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) e os “primers”, em água ultra-pura, numa concentração de 300 nM para ambos os “primers”.

As amplificações de PCR foram realizadas em duplicado, nas seguintes condições: 10 minutos a +95°C para a activação da AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA polimerase, seguido de um total de 40 ciclos a três temperaturas (15 segundos a +94°C para desnaturação, 1 minuto a +60°C para ligação dos “primers” e 30 segundos a +72°C para extensão).

O PCR foi realizado no sistema ABI GeneAmp 5700<sup>1</sup> (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, EUA). As condições de reacção foram definidas num Pentium III Dell Opti Plex GX110 directamente ligado ao sistema de detecção óptico.

Após a amplificação, a quantidade de citocina obtida para cada gene-alvo, em cada amostra, foi utilizada no cálculo do número de cópias das citocinas em estudo.

## **2.7 Quantificação da produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 e IL-10, por ELISA em “Sandwich”**

Um dos métodos que permite a quantificação das citocinas libertadas pelas células em cultura é a ELISA em “Sandwich”. A utilização de um anticorpo de captura, seguido de um segundo anticorpo de detecção para a mesma citocina, confere a esta técnica elevada especificidade e sensibilidade, sendo o limite mínimo de detecção da ordem dos picogramas de proteína.

O ensaio de ELISA foi iniciado com o revestimento de placas de 96 poços de fundo plano (Maxisorp; Nunc) com o anticorpo de captura específico para a citocina em estudo, diluído em tampão de ligação (hidrogenofosfato de sódio 0,1 M, pH 9,0). Após incubação durante 16 horas a +4°C, a placa foi lavada com tampão PBS Tween 20 0,05% (v/v) (Sigma) e adicionado 200  $\mu$ l/poço de tampão de bloqueio [PBS BSA 0,05% (p/v)]. Foi efectuada nova incubação durante uma hora à temperatura ambiente. Após lavagem, foram adicionados 100  $\mu$ l/poço dos padrões, isto é, concentrações conhecidas da citocina recombinante. Paralelamente, foram adicionadas as amostras (100  $\mu$ g/poço de sobrenadante das células leucocitárias) não diluídas e a placa foi incubada durante três horas à temperatura ambiente. Depois de uma nova lavagem, o anticorpo de detecção específico para cada citocina marcado com biotina (BDPharmingen, San Diego, EUA) foi adicionado na concentração de 1  $\mu$ g/ml e incubado durante uma hora à temperatura ambiente. Na revelação foi utilizado 100  $\mu$ l/poço da enzima peroxidase marcada com estreptoavidina (BDPharmingen) diluída 1:1000 em tampão da amostra (PBS BSA 0,05%, Tween

---

<sup>1</sup>Este sistema encontra-se na Unidade de Biologia Molecular, IHMT, a quem agradecemos a disponibilidade para a sua utilização.

20 0,05%), e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente. De seguida, foi adicionado 50 µl/poço do substrato tetrametilbenzidina (TMB; Sigma). Terminado o período de incubação (30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz), a reacção foi bloqueada com 25 µl/poço de ácido sulfúrico 0,25 M e a densidade óptica lida a 450 nm em espectrofotómetro de microELISA (Titer Multiskan Plus MK II; Labsystems, Helsínquia, Finlândia).

Na tabela 4 encontram-se resumidas as concentrações utilizadas do anticorpo de captura e do padrão, e o limite de detecção para cada citocina.

**Tabela 4.** Concentração do anticorpo de captura e das citocinas recombinantes, bem como do limite de detecção da ELISA para cada citocina analisada”

| <b>Citocina</b> | <b>Anticorpo de<br/>captura<br/>(µg/ml)</b> | <b>Citocina<br/>recombinante<br/>(µg/ml)</b> | <b>Limite de<br/>detecção<br/>(pg/ml)</b> |
|-----------------|---|--|---|
| IFN-γ           | 2   | 4000-31,2                                    | 31,2                                      |
| IL-4            | 1   | 2000-7,8                                     | 7,8                                       |
| IL-10           | 4   | 2000-7,8                                     | 7,8                                       |
| IL-12           | 2   | 4000-31,2                                    | 31,2                                      |

A concentração das amostras foi determinada através da curva de calibração para cada citocina, construída com base nos valores de absorvância dos padrões.

### **3. Avaliação da resposta das subpopulações linfocitárias T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> quando estimuladas pelas fracções proteicas libertadas por *L. infantum***

O estudo da imunidade celular induzida pelas fracções proteicas em estudo foi neste objectivo enriquecida com a avaliação da contribuição das subpopulações T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Para tal analisou-se a cinética de produção e expressão das citocinas pelas células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> isoladas do baço de murganhos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. infantum*, estimulados, *in vitro*, pelas fracções proteicas.

#### **3.1 Infecção experimental**

Para cada estirpe de murganhos, C57BL/6 e BALB/c, foram definidos dois grupos: controlo e infectado. O grupo infectado foi inoculado via intraperitoneal com  $5 \times 10^6$  promastigotas virulentos de *L. infantum*. Os promastigotas virulentos foram obtidos na fase estacionária de crescimento em meio RPMI FCS 20%, seguindo o procedimento descrito em 1.1.

#### **3.2 Recolha de material biológico**

Após 30, e 45 dias de infecção, amostras biológicas foram obtidas de dois animais de cada grupo.

Os animais foram sacrificados por secção da cervical e o baço recolhido para determinação da carga parasitária descrito no ponto 2.3. deste capítulo e isolamento das subpopulações de células mononucleares leucocitárias.

#### **3.3 Isolamento das subpopulações linfocitárias T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>**

Os leucócitos mononucleares do baço dos quatro grupos de murganhos obtidos como descrito em 2.4, foram posteriormente separados em subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

A separação magnética é uma das técnicas que permite a purificação de subpopulações linfocitárias e baseia-se na detecção específica das moléculas de superfície dos leucócitos, designadas por CD, através de microesferas magnéticas revestidas com um anticorpo de captura para determinado CD. Como resultado, obtêm-se subpopulações celulares purificadas expressando um CD específico.

O sistema de separação magnética utilizado foi o MidiMACS (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Após o isolamento e quantificação dos leucócitos, as células foram ressuspensas em tampão de eluição (PBS 0.05% BSA p/v) numa concentração final de  $10^7$  células / 90  $\mu$ l. A esta suspensão foram adicionadas 10  $\mu$ l de microesferas magnéticas revestidas por anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8 de murganho (MiltenyiBiotec). Após incubação durante 20 min., a 4°C, procedeu-se à centrifugação das células a 370g, durante 5 min. a 4°C. As células foram colocadas em 3 ml de tampão de eluição e aplicadas na coluna, que fora colocada no suporte do separador magnético, previamente lavada com 3 ml de tampão de eluição. Para recolher a fracção negativa de células fez-se passar 9ml de tampão de eluição pela coluna. Posteriormente a coluna foi removida do separador magnético foram adicionados 5 ml de tampão de eluição, e recuperada a fracção positiva, isto é, células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> purificadas. Em seguida estas células foram colocadas em cultura nas condições descritas em 2.5.

### **3.4 Análise da expressão e produção das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10**

O sobrenadante das culturas foi colhido e os ensaios de ELISA efectuados tal como descrito em 2.7. As células foram utilizadas para extracção do mRNA e realização da PCR em tempo real para quantificação relativa de mRNA de IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 como descrito em 2.6.

## **4. Imunização de murganhos BALB/c com as fracções proteicas High e Low**

Após a análise dos resultados foi decidido efectuar um ensaio de imunização com as fracções que revelaram maior capacidade para induzir uma resposta do tipo protector, do tipo Th 1, as fracções proteicas High e Low.

### **4.1 Protocolo de imunização e infecção**

Foram definidos quatro grupos de murganhos da estirpe BALB/c: dois grupos imunizados com o grupo de fracções proteicas High (saudáveis e infectados) e dois grupos imunizados com o grupo de fracções proteicas Low (saudáveis e infectados). Os murganhos foram inoculados intraperitonealmente com 5 µg/ml de proteína solúvel, semanalmente, durante três semanas. Uma quarta dose foi administrada sete semanas após o início da imunização.

Os animais de um dos grupos imunizados com as fracções High e com as fracções Low foram inoculados via intraperitoneal com  $5 \times 10^6$  promastigotas virulentos de *L. infantum* uma semana depois da última imunização.

### **4.2 Recolha de material biológico**

Após 30 dias de infecção, foram obtidas amostras biológicas de dois animais de cada grupo.

Os animais foram sacrificados por secção da cervical e o baço recolhido para determinação da carga parasitária (como em 2.3) e isolamento das subpopulações de células mononucleares leucocitárias CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (como em 3.4). As subpopulações foram cultivadas na presença de Ag, e das fracções High e Low para análise da capacidade linfoproliferativa (como em 2.5) e dos níveis de expressão e produção de citocinas (como em 2.6 e 2.7, respectivamente).

## 5. Análise estatística

Todas as experiências foram repetidas três vezes e os resultados foram apresentados nos gráficos como a média desses valores, no entanto o tratamento estatístico dos resultados foi efectuado utilizando todos os valores obtidos. A análise estatística dos resultados foi efectuada através do teste não-paramétrico Mann-Whitney, para duas variáveis independentes, o teste de Kruskal-Wallis, para k variáveis independentes ( $k > 2$ ) e pelo teste de Wilcoxon, para duas variáveis emparelhadas, utilizando o programa “Statistical Package for Social Sciences” 10.0 (SPSS Inc., USA). As diferenças observadas foram consideradas significativas para um nível de significância de 5% ( $P < 0.05$ ).

Para cada grupo de murganhos foram comparados os valores de todos os parâmetros estudados ao longo do período de infecção ou imunização relativamente aos animais saudáveis.

A expressão do mRNA das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10, detectada nos leucócitos esplénicos e nas sub-populações linfocitárias *in vitro*, foi comparada entre as amostras dos animais infectados e saudáveis para cada dia de recolha, quer para as células não-estimuladas quer para as células estimuladas com Ag e com as fracções proteicas utilizadas neste trabalho.

Nos ensaios de detecção de citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 produzidas pelos leucócitos esplénicos e pelas sub-populações linfocitárias *in vitro*, foram comparados os níveis das citocinas produzidos pelas células não-estimuladas exogenamente e pelas células cultivadas na presença de Ag, ou das fracções proteicas utilizadas neste estudo (células estimuladas).

## **CAPÍTULO III. RESULTADOS**



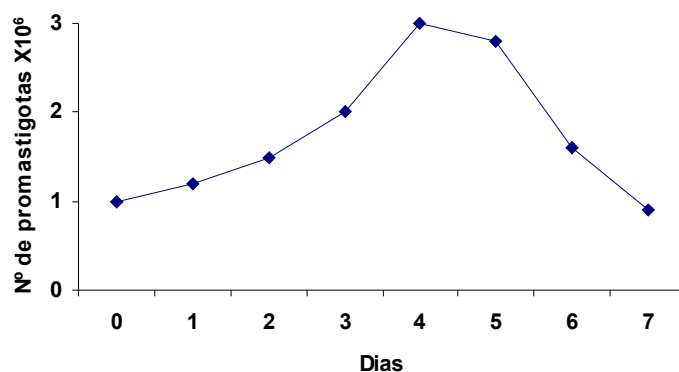
## CAPÍTULO III

### 1. Fracções proteicas libertadas por *L. infantum*

#### 1.1 Recolha de sobrenadantes de cultura de *L. infantum*

Promastigotas virulentos, isto é, com capacidade infectante para o hospedeiro mamífero, foram obtidos *in vitro*, a partir de culturas de baço e fígado de hamsters infectados por *Leishmania infantum* zimodeme MON-1, e colocados em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino para determinação da curva de crescimento. Com base nos resultados obtidos (Fig.3) foi estipulado que a colheita dos sobrenadantes fosse efectuada à terceira passagem e ao 4º dia de crescimento, que corresponde ao fim da fase logarítmica de crescimento e início da fase estacionária, referida como a fase de maior virulência (Santos-Gomes & Abranches, 1996).

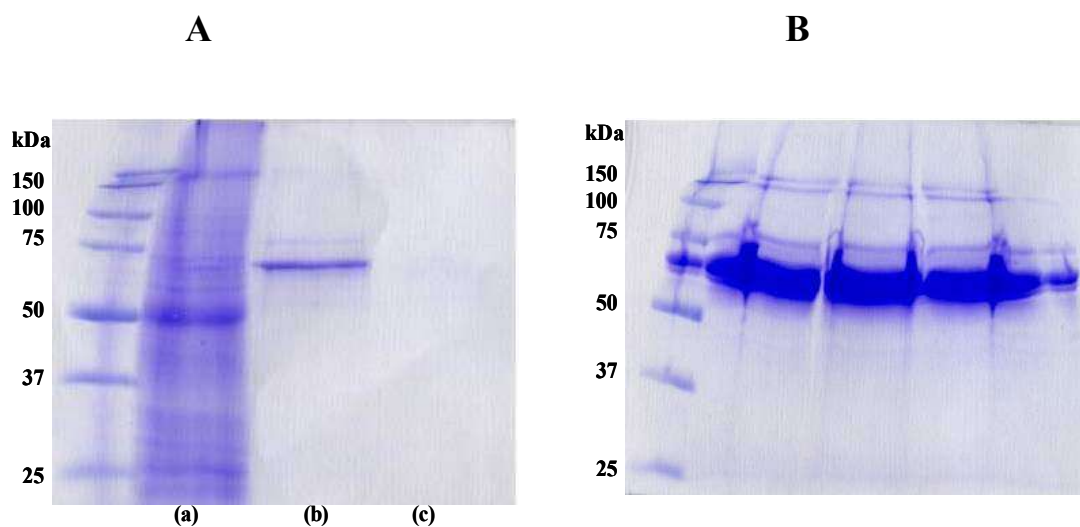
**Figura 3** - Curva de crescimento de promastigotas virulentos de *L. infantum* em meio RPMI 20% FCS



## 1.2. Identificação das fracções proteicas libertadas por *L. infantum*

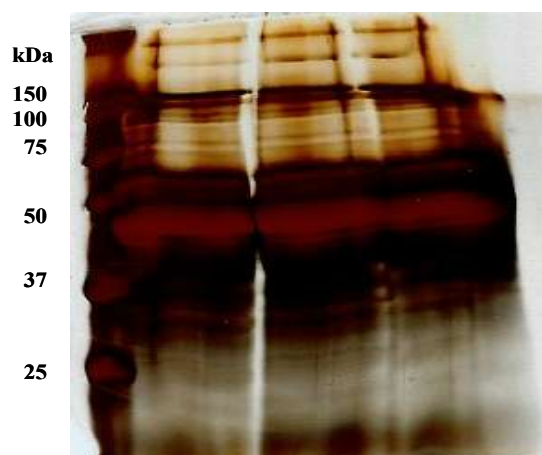
Após a separação electroforética dos sobrenadantes das culturas e coloração do gel, identificou-se apenas uma zona com duas bandas proteicas (Fig. 4A). Porém, após ter sido efectuada a concentração do sobrenadante (x10000) e ter-se realizado nova electroforese, identificaram-se duas zonas com bandas proteicas, uma mais ténue acima dos 75 kDa e outra muito intensa entre os 75 e os 37 kDa (Fig 4B).

**Figura 4 A** – Separação electroforética do antígeno solúvel de *L. infantum* (a), das fracções proteicas libertadas pelos promastigotas (b) e do meio utilizado na obtenção dos sobrenadantes; **B** - Separação electroforética dos sobrenadantes de culturas de *L. infantum* concentrados 10000 vezes.



Dado a mais elevada sensibilidade do nitrato de prata relativamente às proteínas, a sua utilização permitiu identificar um novo conjunto de bandas proteicas com massa molecular inferior a 37 kDa (Fig. 5).

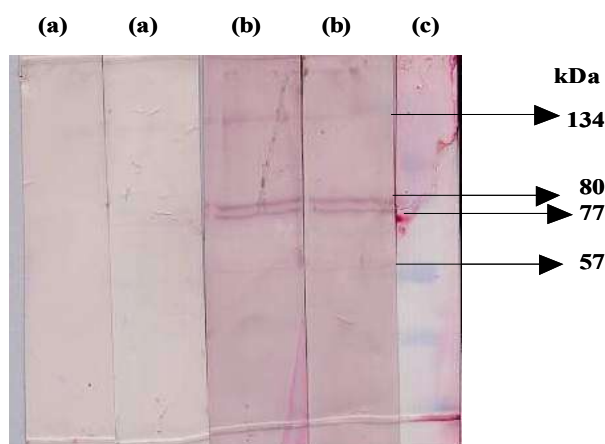
**Figura 5** – Separação electroforética das proteínas libertadas por *L. infantum* e coloração com nitrato de prata



As fracções proteicas foram divididas em três grupos segundo a sua massa molecular: > 75 kDa (Elevada - High), 37-75kDa (Intermédia - Inter) e < 37kDa (Baixa - Low).

Posteriormente efectuou-se um “Immunoblot” em que foi verificado que as fracções proteicas eram reconhecidas por anticorpos presentes no soro de cães experimentalmente infectados com *L. infantum* (Fig.6), tendo-se demonstrado que as proteínas eram de *L. infantum*.

**Figura 6** – Os anticorpos anti-*Leishmania* presentes no soro de cães reconheceram quatro fracções proteicas diferentes; tiras de nitrocelulose com as fracções proteicas libertadas por *L. infantum* incubadas com soros de cão saudáveis (a) e com soros de cão com leishmaniose canina (b); marcador de massa molecular (c).



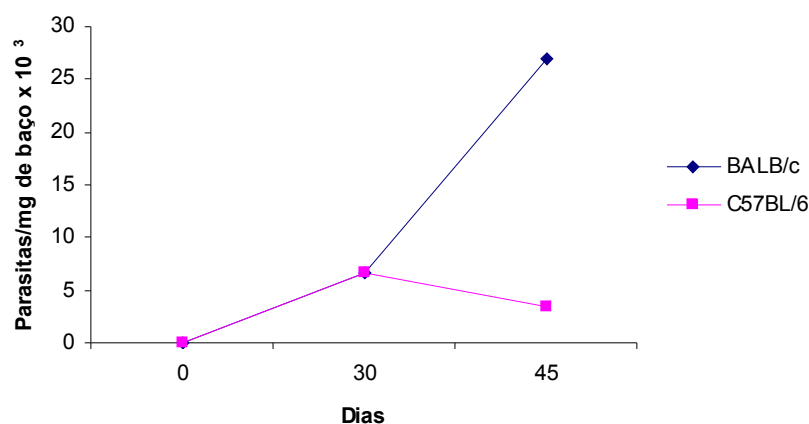
## 2. Avaliação dos efeitos das proteínas libertadas por *L. infantum* na resposta imunológica do hospedeiro

### 2.1 Densidade parasitária – Diluição Limite

Ambas as estirpes de murganhos utilizados neste estudo (BALB/c e C57BL/6) apresentaram em média a mesma densidade parasitária no baço,  $6,7 \times 10^3$  promastigotas/mg ao fim de 30 dias de infecção.

No dia 45 após infecção a estirpe BALB/c apresentou um aumento na carga parasitária ( $2,7 \times 10^4$  promastigotas/mg), enquanto que no baço da estirpe C57BL/6, a densidade parasitária diminuiu ( $3,7 \times 10^3$  promastigotas/mg) (Fig. 7).

**Figura 7** – Densidade parasitária observada no baço de murganhos BALB/c e C57BL/6 30 e 45 dias após infecção.

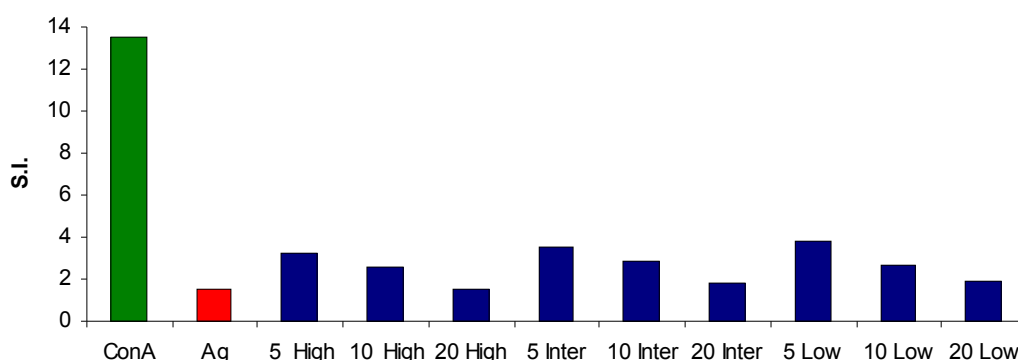


### 2.2 Efeito das fracções proteicas na indução de proliferação linfocitária

Efectuou-se um estudo prévio para determinar a concentração dos grupos de fracções proteicas a utilizar na proliferação linfocitária. Utilizaram-se células mononucleares do sistema fagocítico do baço de murganhos C57BL/6 infectados com *L. infantum*, estimulados com os três grupos de fracções proteicas nas concentrações de 5 µg/ml, 10

$\mu\text{g/ml}$  e  $20 \mu\text{g/ml}$ , com o mitogénio concanavalina A (Con A) e com antígeno solúvel (Ag) de *Leishmania* (Fig. 8).

**Figura 8** – Proliferação dos linfócitos do baço de murganhos C57BL/6 infectados com *L. infantum*, estimulados com o mitogénio concanavalina A (Con A), com antígeno solúvel de *Leishmania* (Ag) e com os três grupos de fracções proteicas nas concentrações de  $5 \mu\text{g/ml}$ ,  $10 \mu\text{g/ml}$  e  $20 \mu\text{g/ml}$ .

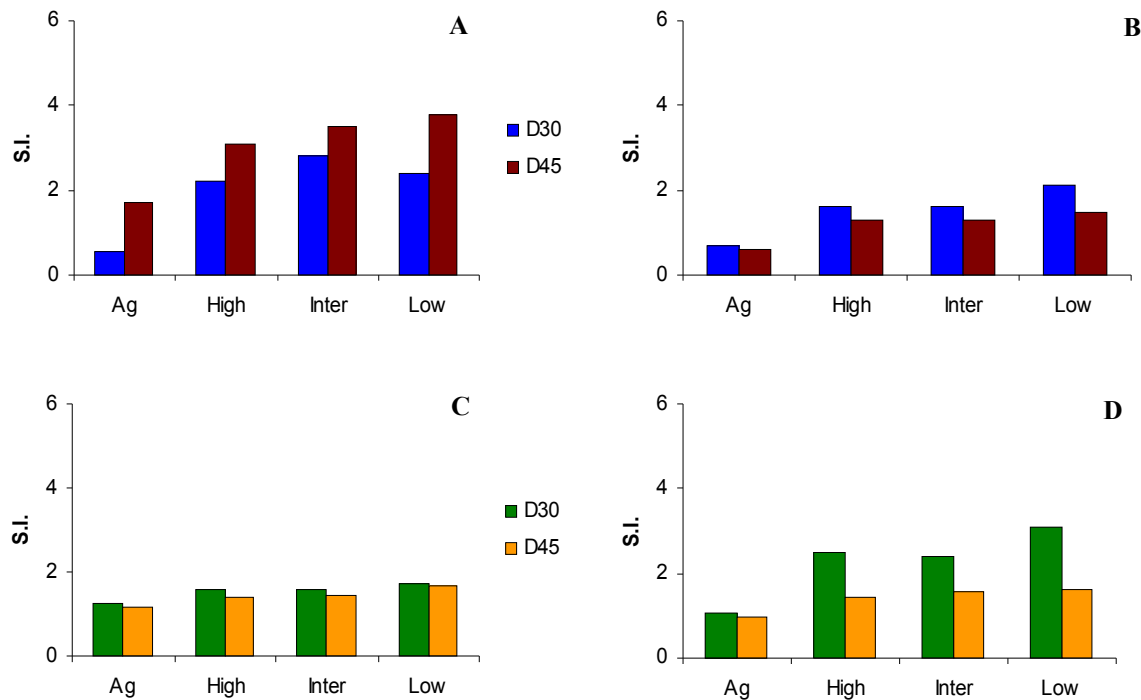


Considerou-se a concentração de  $5 \mu\text{g/ml}$  mais adequada para os três grupos proteicos. Esta concentração foi utilizada em todas as experiências de proliferação.

### 2.2.1 – Linfócitos totais

Nos murganhos C57BL/6 infectados, os grupos de fracções proteicas em estudo induziram uma maior multiplicação das células mononucleares do baço ( $p=0,036$ ) comparativamente ao Ag. Verificou-se, também, que independentemente do tipo de antígeno utilizado o índice de estimulação aumentou com a diminuição da carga parasitária (Fig. 9A). Nos murganhos BALB/c infectados a estimulação de células mononucleares do sistema fagocítico do baço pelos grupos de fracções proteicas ou pelo Ag é idêntica independentemente da evolução da infecção (Fig. 9C). Nos murganhos BALB/c (Fig. 9D) e C57BL/6 (Fig. 9B) saudáveis as fracções proteicas estimularam a multiplicação celular para níveis ligeiramente superiores aos induzidos pelo Ag.

**Figura 9** - Índices de estimulação (S.I.) dos linfócitos esplênicos de murganhos C57BL/6 infectados (A) e saudáveis (B) e de BALB/c infectados (C) e saudáveis (D), após estimulação com os diferentes antígenos (Ag, High, Inter e Low) nos dias 30 e 45 após a infecção.

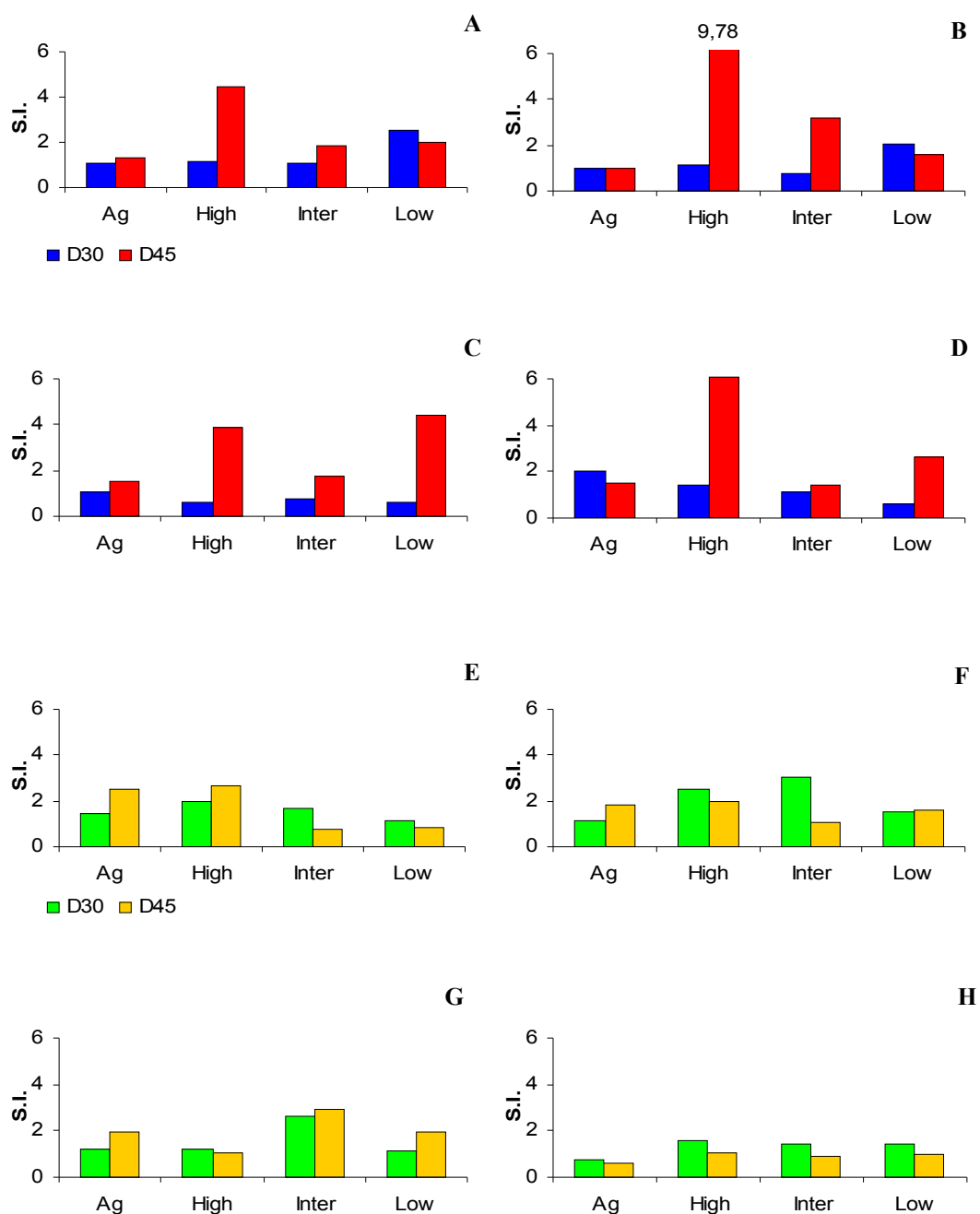


### 2.2.2 – Células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup>

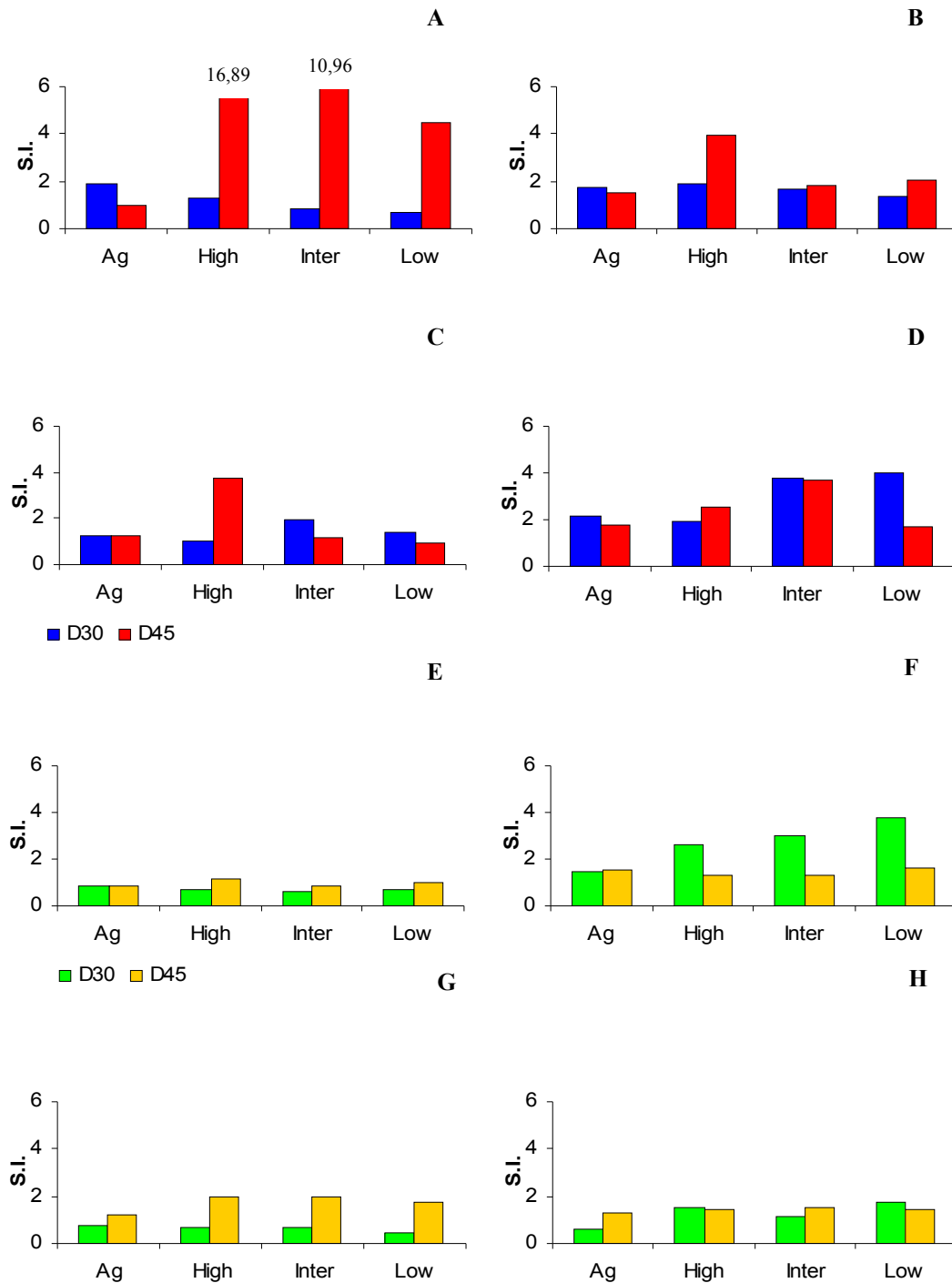
Nos murganhos C57BL/6 com 45 dias de infecção, o grupo de fracções proteicas High induziu uma maior multiplicação das células CD4<sup>+</sup> (Fig. 10A) e CD4<sup>-</sup> (Fig. 10B), que atingiu, no caso das células CD4<sup>-</sup> valor estatisticamente significativo ( $P=0,049$ ). No entanto o S.I. das células T CD4<sup>+</sup> foi idêntico ao observado nos animais saudáveis (Fig. 10C). A fracção High também induziu aumento de proliferação das células CD4<sup>-</sup> dos murganhos controlo (fig. 10D).

Na estirpe BALB/c infectada, a estimulação de células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> pelos grupos de fracções proteicas ou pelo Ag não apresentou diferenças significativas, independentemente da evolução da infecção (Fig. 10E e F). Os níveis de proliferação observados foram semelhantes aos animais controlo (Fig. 10G e H).

**Figura 10** - Índices de estimulação das subpopulações de células CD4<sup>+</sup> (A, C, E, G) e CD4<sup>-</sup> (B, D, F, H) após estimulação com os diferentes antígenos (Ag, High, Inter e Low) nos dias 30 e 45 de observação em murganhos C57BL/6 infectados (A, B) e saudáveis (C, D) e em murganhos BALB/c infectados (E, F) e saudáveis (G, H).



**Figura 11** - Índices de estimulação das subpopulações de células CD8<sup>+</sup> (A, C, E, G) e CD8<sup>-</sup> (B, D, F, H) pelos diferentes antígenos (Ag, High, Inter e Low) nos dias 30 e 45 em murganhos C57BL/6 infectados (A, B) e saudáveis (C, D) e murganhos BALB/c infectados (E, F) e saudáveis (G, H).





Nos animais infectados com 45 dias de observação, verificou-se multiplicação elevada das células CD8<sup>+</sup> (Fig. 11A) quando estimuladas pelas fracções proteicas High (P=0,046) e Inter (P=0,049). Observou-se ainda, um ligeiro aumento de proliferação das células CD8<sup>+</sup> estimuladas pela fracção Low e CD8<sup>-</sup> estimuladas pela fracção High (Fig.11B).

Nos murganhos BALB/c infectados, a estimulação de células CD8<sup>+</sup> (Fig. 11E) do baço pelos grupos de fracções proteicas ou pelo Ag foi semelhante ao observado nos animais controlo (Fig. 11G). Por outro lado, nas células CD8<sup>-</sup>, verificou-se um ligeiro aumento do índice de estimulação induzido pelas fracções proteicas em estudo, no dia 30 p.i. (Fig. 11F). Nos murganhos BALB/c saudáveis, não se observaram diferenças na estimulação das células CD8<sup>-</sup>, induzida pelos grupos de fracções proteicas, em qualquer um dos dias de colheita (Fig.11H).

## **2.3 Indução da expressão de citocinas pelas fracções proteicas.**

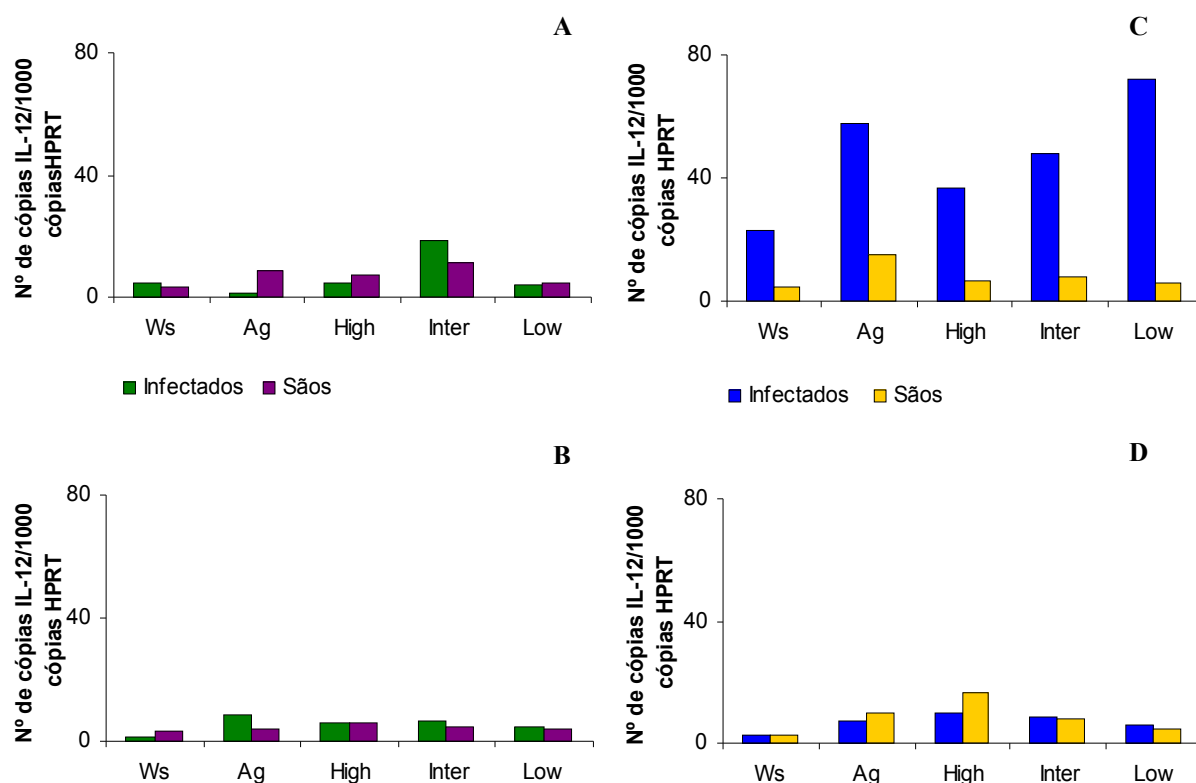
### **2.3.1 – Linfócitos totais**

#### **2.3.1.1 – IL-12**

A expressão de IL-12 observada nas células esplénicas estimuladas e não estimuladas de BALB/c infectados e saudáveis foi reduzida (Fig. 12A e B).

Os linfócitos estimulados e não estimulados do baço de C57BL/6 com 30 dias de infecção apresentaram um elevado número de cópias de mRNA de IL-12 (Fig. 12A), enquanto que no dia 45 p.i. a expressão de IL-12 sofreu uma redução significativa (P=0,004) (Fig 12D).

**Figura 12** – Níveis de expressão de IL-12 pelos linfócitos do baço de murganhos BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D) aos 30 (A, C) e 45 dias (B, D) após a inoculação dos parasitas.



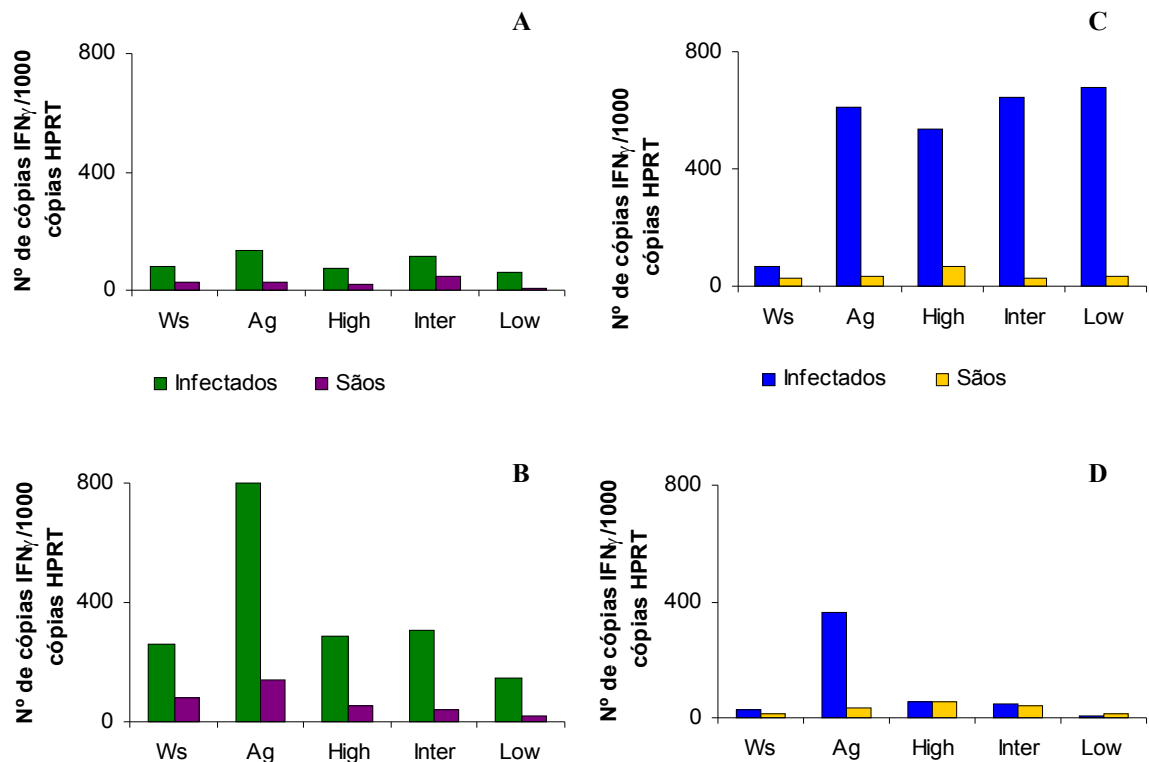
### 2.3.1.2 - $IFN\gamma$

No dia 30 p.i., o número de cópias de mRNA de  $IFN\gamma$  observadas nos linfócitos estimulados e não estimulados do baço de murganhos BALB/c infectados foi ligeiramente maior do que o verificado nos animais saudáveis desta estirpe (Fig. 13A). Acompanhando o aumento da carga parasitária, ao dia 45 p.i., o número de cópias de  $IFN\gamma$  aumentou significativamente nas células estimuladas pelo Ag ( $P=0,001$ ). No entanto, os três grupos proteicos induziram níveis de expressão desta citocina semelhantes à observada nas células não estimuladas (Fig. 13B).

Nos murganhos C57BL/6 as células estimuladas expressaram elevados níveis de mRNA de  $IFN\gamma$  no dia 30 p.i. (Fig.13C), porém, no dia 45 p.i. ocorreu uma redução

significativa ( $P=0,049$ ), que foi mais evidente nas células estimuladas pelas três fracções proteicas em estudo (Fig. 13D).

**Figura 13** – Níveis de expressão de  $\text{IFN}\gamma$  pelos linfócitos do baço de murganços BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D) aos 30 (A, C) e 45 dias (B, D) após a inoculação dos parasitas.

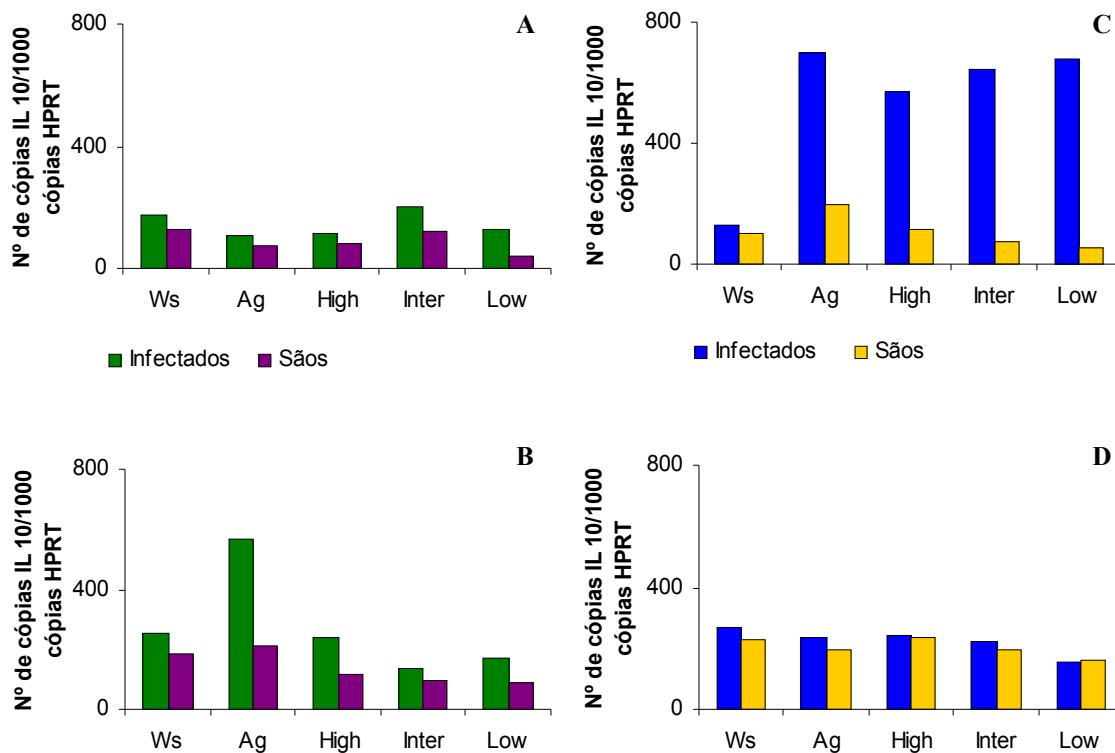


### 2.3.1.3 – IL-10

As células estimuladas e não estimuladas do baço dos BALB/c infectados expressaram níveis de mRNA de IL-10 semelhantes aos verificados nos animais saudáveis, durante todo o período de infecção (Fig. 14A e B). A única exceção foi o aumento do número de cópias de mRNA nas células estimuladas pelo Ag ( $P=0,049$ ), no dia 45 p.i. (Fig. 14B).

Os linfócitos esplênicos dos murganhos C57BL/6 estimulados apresentaram um aumento acentuado ( $P=0,036$ ) na expressão de IL-10 ao dia 30 de observação (Fig. 14C). Contudo, no dia 45 p.i., o número de cópias de mRNA de IL-10 decresceu para valores semelhantes aos verificados nos animais saudáveis (Fig. 14D). Esta diminuição foi estatisticamente significativa ( $P=0,034$ ).

**Figura 14** – Níveis de expressão de IL-10 pelos linfócitos do baço de murganhos BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D) aos 30 (A, C) e 45 dias (B, D) após a inoculação dos parasitas.

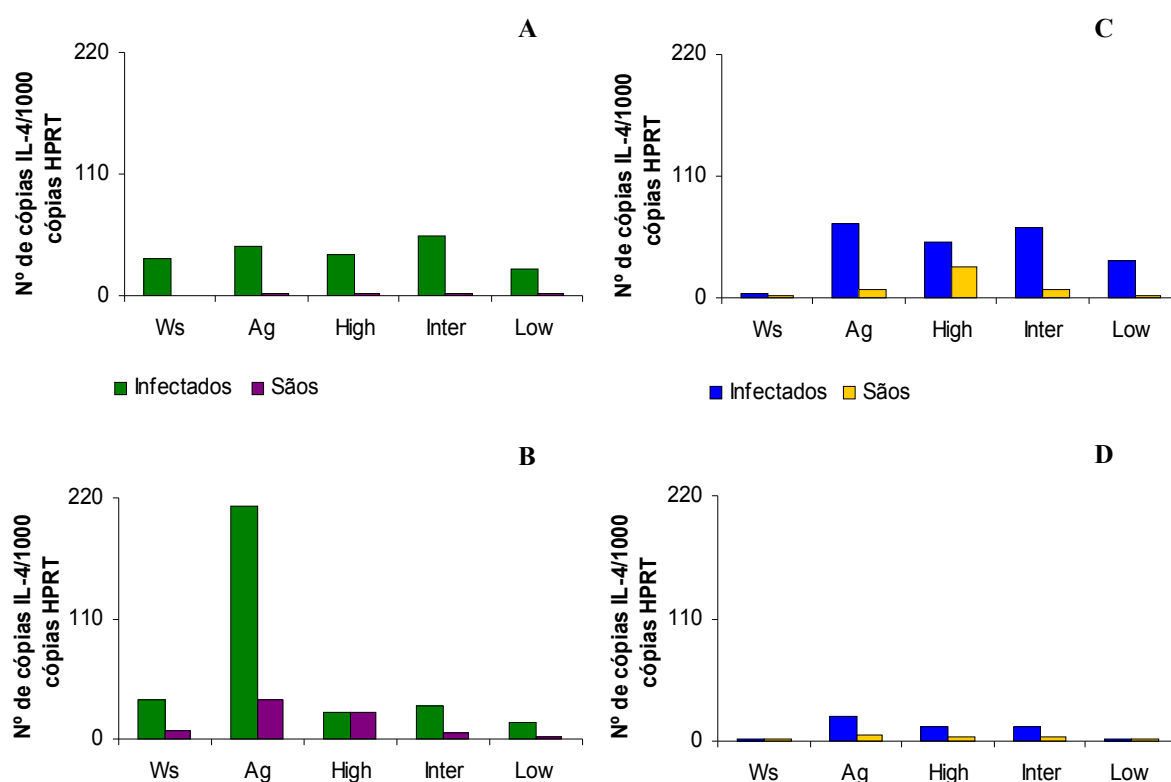


#### 2.3.1.4 – IL-4

As células estimuladas e não estimuladas do baço dos murganhos BALB/c infectados e saudáveis, apresentaram um número reduzido de cópias de mRNA de IL-4 em ambos os

dias de colheita (Fig 15A, B), excepto no dia 45 em que o número de cópias detectado nas células de animais infectados estimuladas pelo Ag, foi significativamente mais elevado ( $P=0,043$ ) (Fig. 15B).

**Figura 15** – Níveis de expressão de IL-4 pelos linfócitos do baço de murganhos BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D) aos 30 (A, C) e 45 dias (B, D) após a inoculação dos parasitas.



Nos murganhos C57BL/6 foi observada expressão de IL-4 nos linfócitos do dia 30 p.i. (Fig. 15C), que se tornou mínima ao dia 45 p.i. (Fig. 15D).

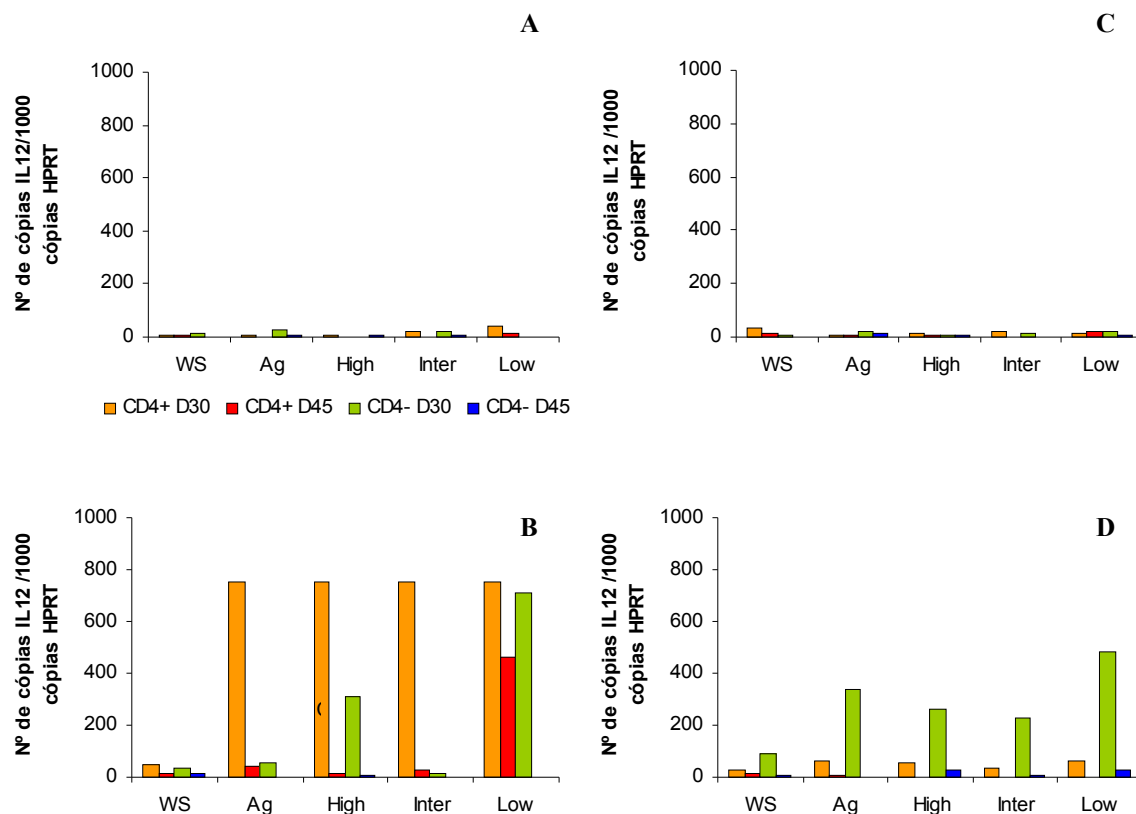
### 2.3.2 - Células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup>

#### 2.3.2.1 - IL-12

As células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> dos animais saudáveis de ambas as estirpes revelaram expressão limitada ou inexistente de IL-12 (Fig. 16A, C).

Na estirpe BALB/c verificou-se um significativo aumento da expressão ( $P=0,016$ ) de IL-12 nas células CD4<sup>+</sup> estimuladas pelo Ag e pelas três fracções proteicas, no dia 30 p.i. Nesta subpopulação celular, o número de cópias de mRNA de IL-12 foi também significativo ( $P=0,037$ ), no dia 45, quando estimulada pelo grupo Low. Nas células CD4<sup>-</sup> estimuladas pelas fracções proteicas High ( $P=0,041$ ) e principalmente Low ( $P=0,022$ ), também se observou uma expressão aumentada no dia 30 p.i. (Fig. 16B).

**Figura 16** – Níveis de expressão de IL-12 pelas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganços BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D), saudáveis (A, C) e infectados (B, D), aos 30 e 45 dias após a inoculação dos parasitas.



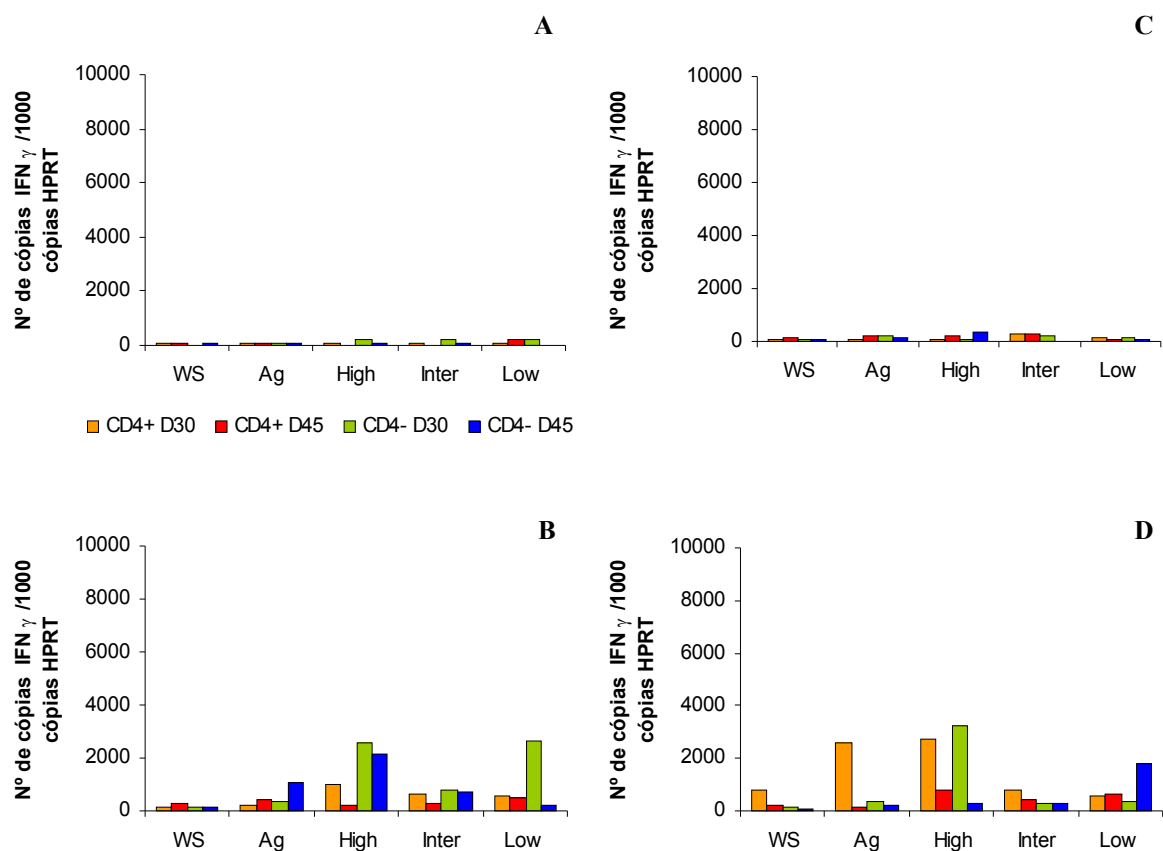
Nos murganhos C57BL/6, o número de cópias de mRNA de IL-12 foi significativamente maior ( $P=0,045$ ) nas células  $CD4^+$  estimuladas pelo Ag e pelas três fracções proteicas, no dia 30 de p.i. (Fig. 16D).

### 2.3.2.2 - $IFN\gamma$

As células  $CD4^+$  e  $CD4^-$  de murganhos BALB/c e C57BL/6 saudáveis revelaram, em todos os casos, um reduzido número de cópias de mRNA de  $IFN\gamma$  (Fig. 17A e C).

Nos murganhos BALB/c infectados, a expressão de  $IFN\gamma$  foi significativamente superior nas células  $CD4^-$  estimuladas pelos grupos de fracções proteicas High ( $P=0,019$ ) e Low ( $P=0,017$ ) no dia 30 de colheita.

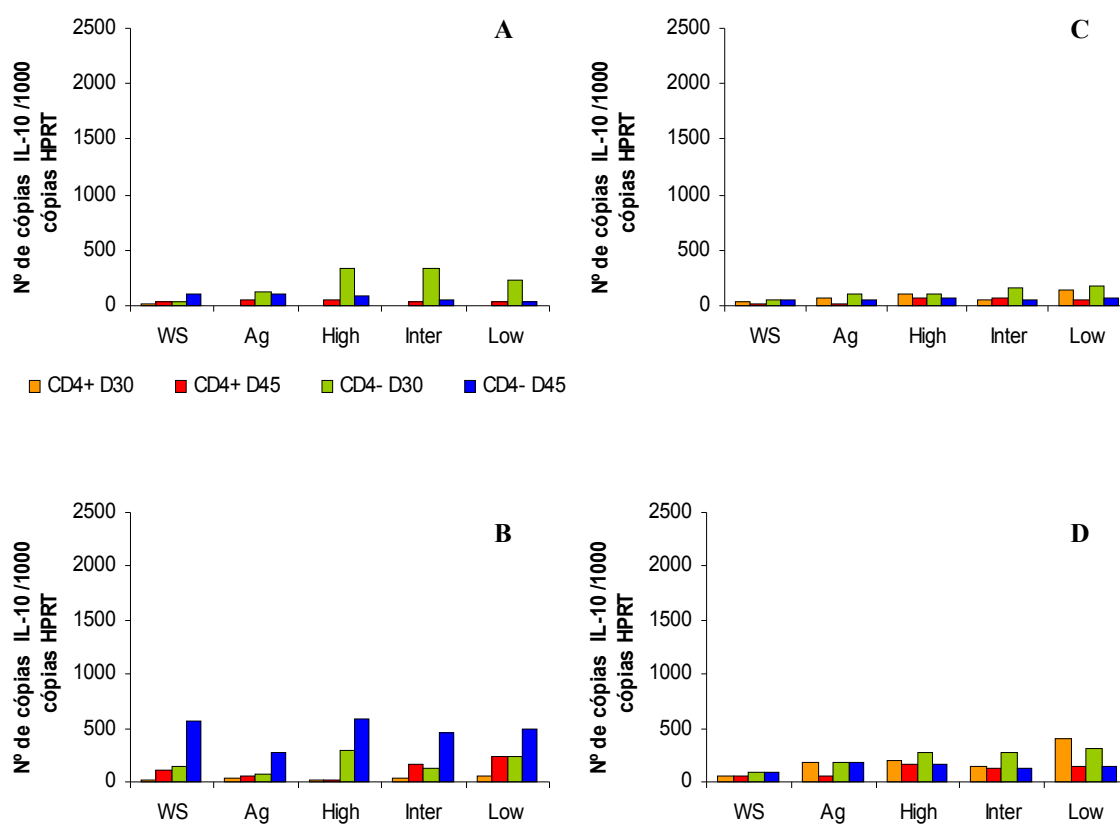
**Figura 17** – Níveis de expressão de  $IFN\gamma$  pelas células  $CD4^+$  e  $CD4^-$  do baço de murganhos BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D), saudáveis (A, C) e infectados (B, D), aos 30 e 45 dias após a inoculação dos parasitas.



A expressão desta citocina foi também mais elevada nas células estimuladas pela fracção proteica High ( $P=0,025$ ), no dia 45p.i. Nas células  $CD4^+$  estimuladas pelas três fracções proteicas em estudo, foi observada uma expressão significativa de  $IFN\gamma$  ( $P=0,015$ ) no dia 30 p.i. Porém, no dia 45 p.i. apenas as células estimuladas pelo grupo Low apresentaram níveis de expressão significativos ( $P=0,046$ ) (Fig. 17B).

Nos murganços C57BL/6, a expressão de  $IFN\gamma$  foi mais elevada nas células  $CD4^+$  estimuladas com Ag ( $P=0,033$ ) e com a fracção proteica High ( $P=0,032$ ), no dia 30 p.i. As células  $CD4^+$  estimuladas com a fracção High apresentaram, também, um número de cópias de mRNA de  $IFN\gamma$  considerável ( $P=0,015$ ). No dia 45, a expressão desta citocina encontrava-se significativamente aumentada ( $P=0,044$ ) nas células  $CD4^+$  estimuladas pela fracção Low (Fig 17D).

**Figura 18** – Níveis de expressão de IL-10 pelas células  $CD4^+$  e  $CD4^-$  do baço de murganços BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D), saudáveis (A, C) e infectados (B, D), aos 30 e 45 dias após a inoculação dos parasitas.





#### 2.3.2.3 - *IL-10*

As células dos animais saudáveis apresentaram, de um modo geral, níveis reduzidos de mRNA de IL-10 (Fig. 18A, C). No dia 30 após a inoculação dos parasitas, a expressão de IL-10 foi maior nas células CD4<sup>+</sup> estimulada pela fracção High, nos murganhos BALB/c, contudo não foi diferente do observado nos animais saudáveis. No dia 45, o número de cópias de mRNA de IL-10 foi superior nas células CD4<sup>+</sup> não estimuladas e estimuladas com as três fracções proteicas em estudo (Fig. 18B).

Nos murganhos C57BL/6, a expressão de IL-10 não apresentou variação significativa em ambas as subpopulações celulares e nos dois dias de colheita, excepto nas células CD4<sup>+</sup> do dia 30 p.i. ( $p=0,047$ ) estimuladas pela fracção Low (Fig. 18D).

#### 2.3.2.4 - *IL-4*

Nos animais saudáveis a expressão de IL-4 foi sempre extremamente reduzida ou indetectável (Fig. 19A, C). Na estirpe BALB/c a expressão de IL-4 foi significativamente superior ( $P=0,024$ ) nas células CD4<sup>+</sup> estimuladas pelo Ag e pelas três fracções em estudo, no dia 30 de observação, sendo residual ou indetectável ao dia 45 p.i. Nas células CD4<sup>+</sup> a expressão desta citocina apresentou níveis muito reduzidos ou indetectáveis (Fig. 19B).

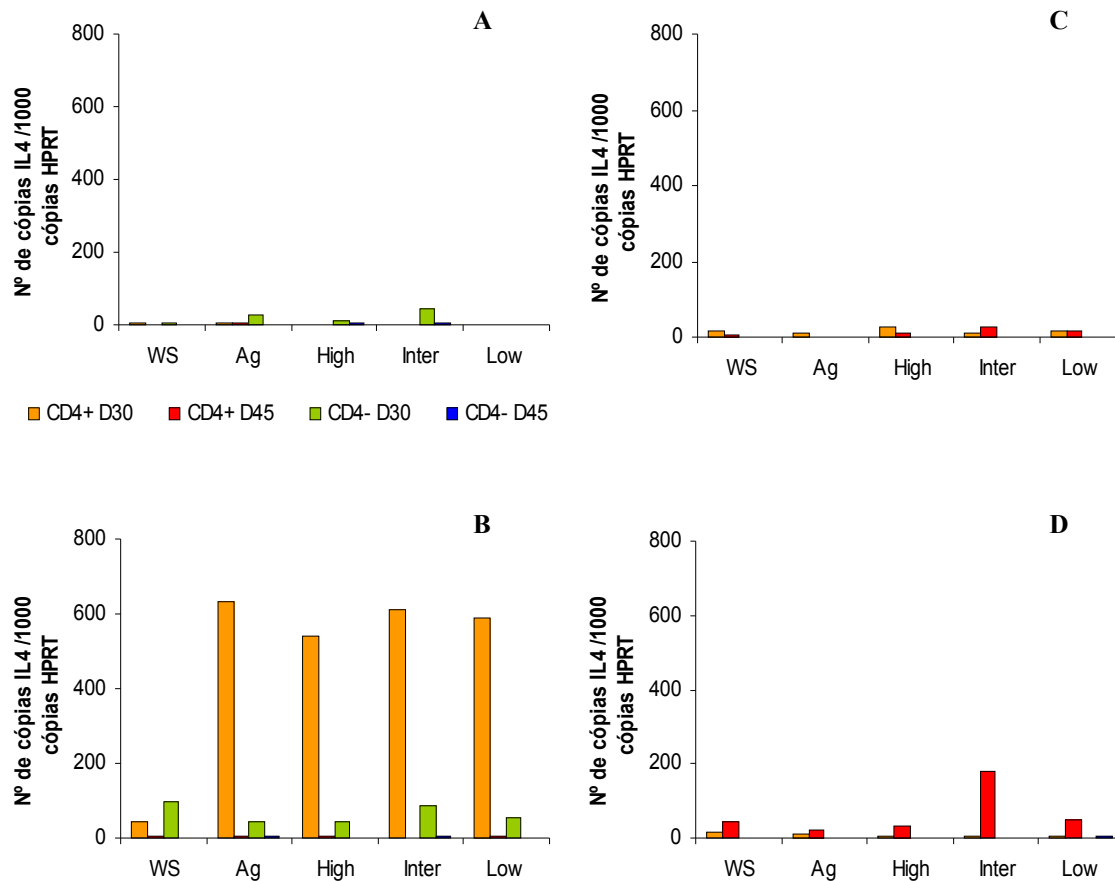
Nos murganhos C57BL/6, o número de cópias de mRNA de IL-4 foi apenas significativo ( $P=0,049$ ) nas células CD4<sup>+</sup> estimuladas pela fracção Inter, no dia 45 após a inoculação dos parasitas (Fig. 19D).

### 2.3.3 – Células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup>

#### 2.3.3.1 *IL-12*

Em ambas as estirpes de murganhos, as células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> de animais saudáveis revelaram níveis baixos de mRNA de IL-12 ou até indetectáveis em alguns casos (Fig. 20A, C).

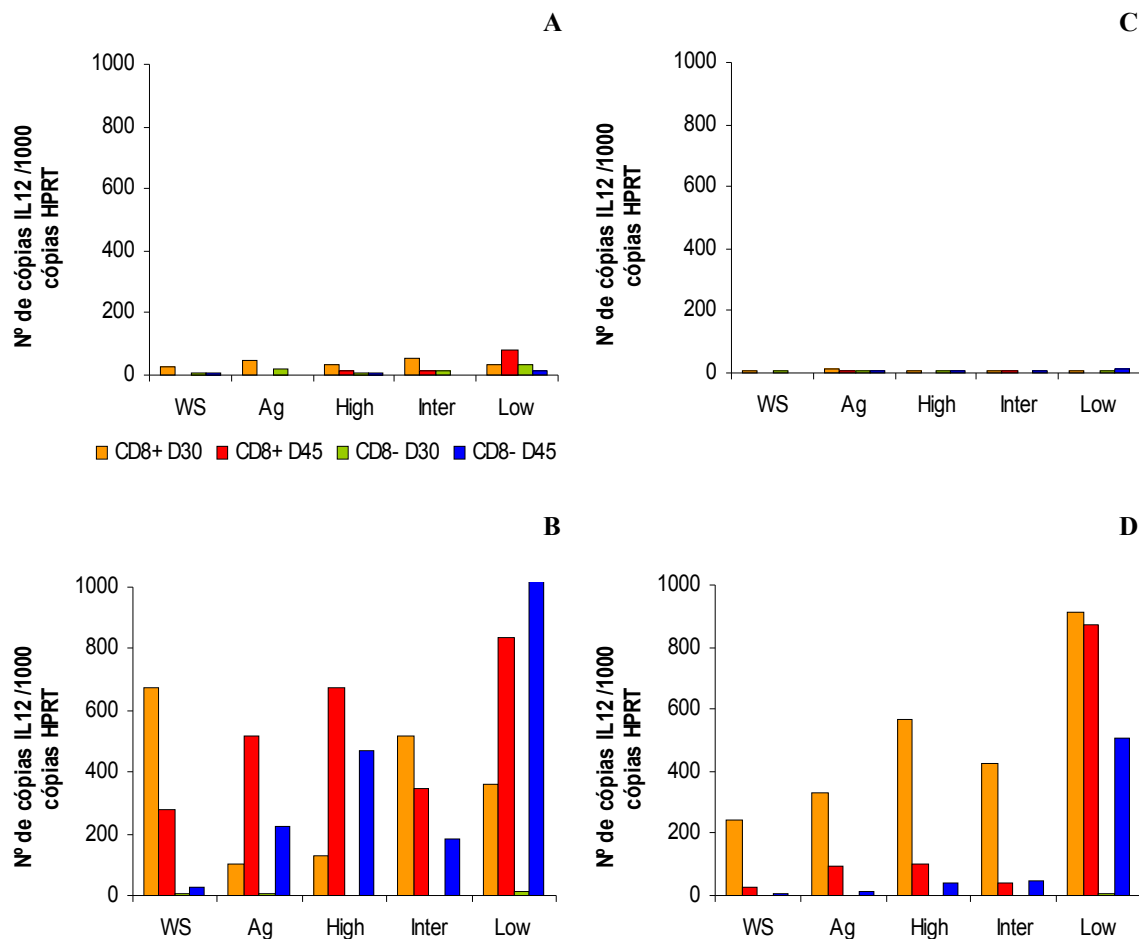
**Figura 19** – Níveis de expressão de IL-4 pelas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganços BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D), saudáveis (A, C) e infectados (B, D), aos 30 e 45 dias após a inoculação dos parasitas.



Na estirpe BALB/c, com 30 dias p.i., o número de cópias de mRNA de IL-12 foi mais elevado nas células CD8<sup>+</sup> não estimuladas e estimuladas pela fracção Inter. Porém, no dia 45 p.i., a expressão de IL-12 foi significativamente elevada ( $p=0,036$ ), em células estimuladas com a fracção Low. Igualmente neste dia, foi também significativo o número de cópias de mRNA de IL-12 detectado nas células CD8<sup>-</sup> estimuladas pelos grupos High ( $P=0,047$ ) e Low ( $P=0,017$ ) (Fig. 20B).

Nos murganços C57BL/6, a expressão de IL-12 foi superior nas células CD8<sup>+</sup> ( $P_{D30}=0,038$ ;  $P_{D45}=0,016$ ) em ambos os dias de colheita, e nas células CD8<sup>-</sup> no dia 45 p.i. ( $P=0,023$ ) após estimulação com a fracção Low (Fig. 20D).

**Figura 20** – Níveis de expressão de IL-12 pelas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganços BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D), saudáveis (A, C) e infectados (B, D), aos 30 e 45 dias após a inoculação dos parasitas.

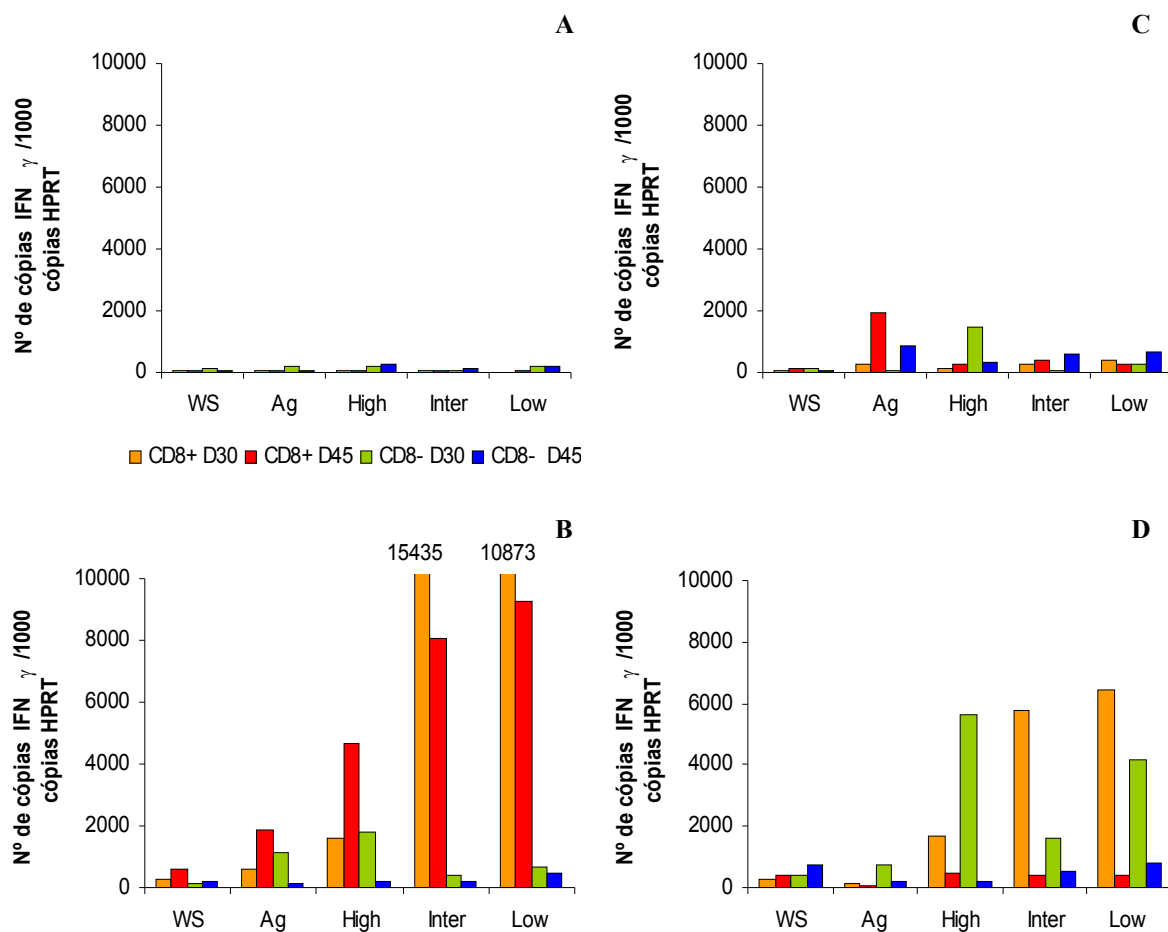


### 2.3.3.2 *IFN* $\gamma$

Os linfócitos CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> dos murganços saudáveis revelaram baixos níveis de expressão de IFN $\gamma$  (Fig 21A e C). Na estirpe BALB/c infectados a expressão de IFN $\gamma$  foi significativamente maior ( $P=0,043$ ) nas células CD8<sup>+</sup> estimuladas pelas fracções Inter e Low em ambos os dias de colheita. Embora com um valor menor, as células estimuladas pela fracção High também revelaram aumento de expressão no dia 45 p.i.

Nos murganhos C57BL/6 infectados, o número de cópias de mRNA de IFN $\gamma$  foi significativamente elevado ( $P=0,048$ ) nas células CD8 $^{+}$  estimuladas pelas três fracções proteicas em estudo, no dia 30, mas sobretudo com as fracções Inter e Low.

**Figura 21** – Níveis de expressão de IFN $\gamma$  pelas células CD8 $^{+}$  e CD8 $^{-}$  do baço de murganhos BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D), saudáveis (A, C) e infectados (B, D), aos 30 e 45 dias após a inoculação dos parasitas.

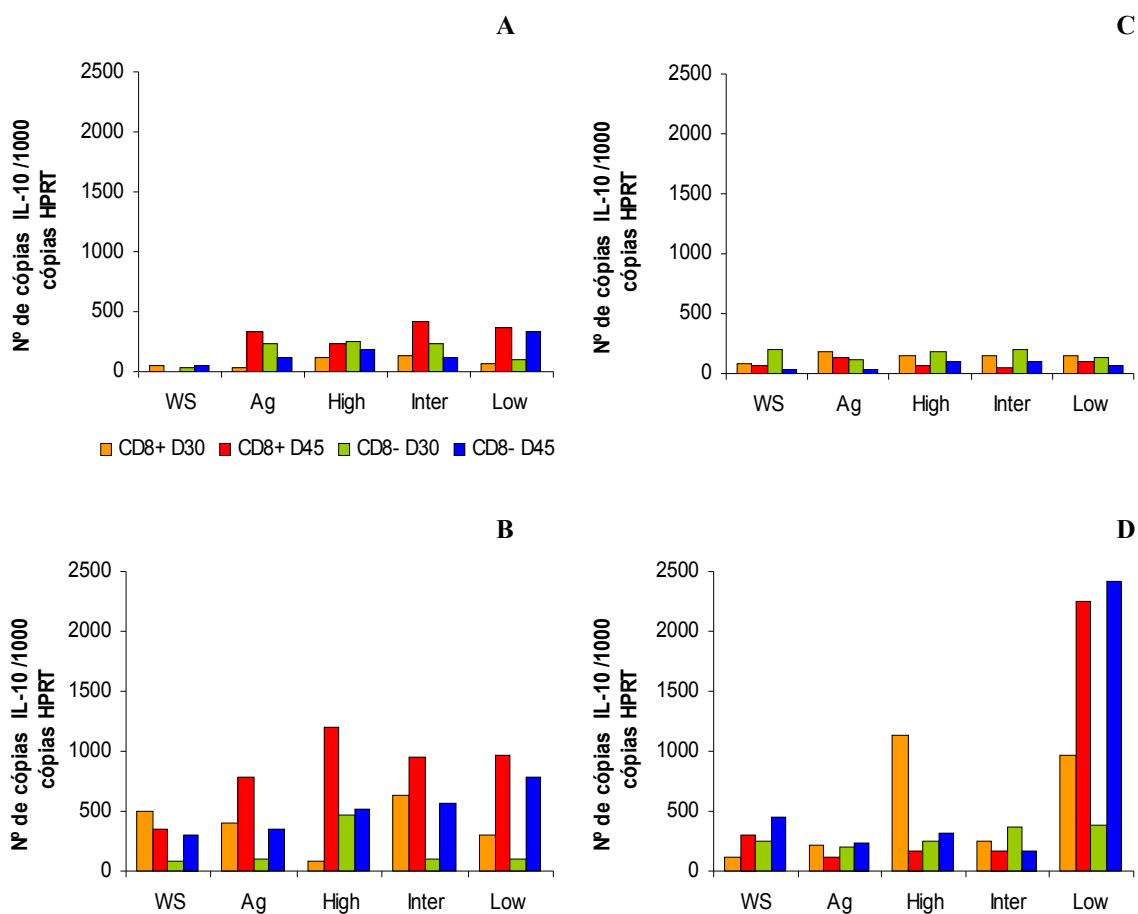


A expressão desta citocina foi também elevada nas células CD8 $^{-}$  estimuladas pelas fracções High ( $P=0,040$ ) e Low ( $P=0,039$ ) (Fig. 21D).

### 2.3.3.3 *IL-10*

Em ambas as estirpes de murganhos saudáveis os níveis de expressão de IL-10 foram sempre bastante reduzidos (Fig. 22A, C).

**Figura 22** – Níveis de expressão de IL-10 pelas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D), saudáveis (A, C) e infectados (B, D), aos 30 e 45 dias após a inoculação dos parasitas.



Nos murganhos BALB/c infectados, a expressão de IL-10 foi mais elevada nas células CD8<sup>+</sup> não estimuladas e estimuladas com a fracção Inter no dia 30 de colheita, e nas células estimuladas por Ag e pelas três fracções proteicas no dia 45 p.i. No caso das fracções proteicas, o valor observado foi estatisticamente significativo ( $P_{\text{High}}=0,041$ ;  $P_{\text{Inter}}=0,047$ ;  $P_{\text{Low}}=0,047$ ). As células CD8<sup>-</sup> apresentaram também um aumento do

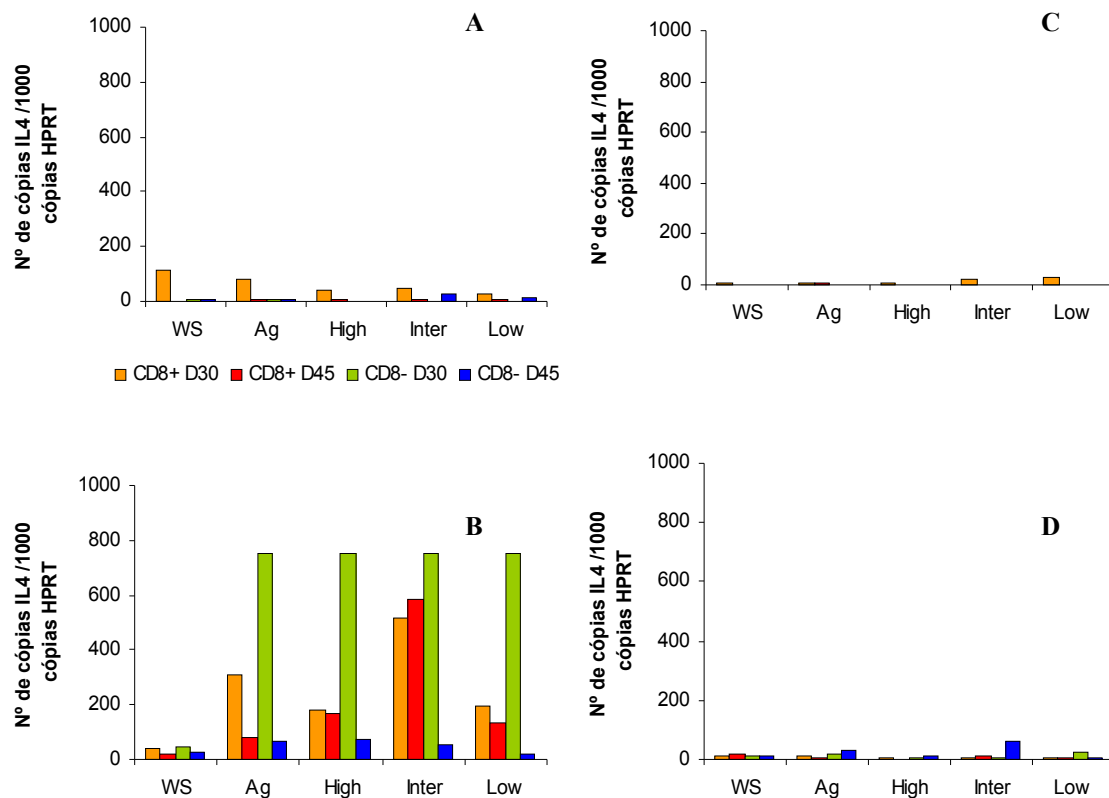
número de cópias do mRNA de IL-10 ao dia 30 de infecção quando estimuladas pela fracção High ( $P=0,045$ ) (Fig. 22B).

Na estirpe C57BL/6, o número de cópias de mRNA de IL-10 foi significativamente maior nas células  $CD8^+$  estimuladas pelas fracções High ( $P=0,028$ ) e Low ( $P=0,032$ ), no dia 30 após a inoculação dos parasitas. No dia 45, a expressão desta citocina foi também elevada nas células  $CD8^+$  ( $P=0,012$ ) e  $CD8^-$  ( $P=0,011$ ) estimuladas pela fracção Low (Fig. 22D).

#### 2.3.3.4 IL-4

Nos murganhos saudáveis os níveis de mRNA de IL-4 apresentados pelas células  $CD8^+$  e  $CD8^-$  foi reduzido ou até inexistente (Fig. 23A e C).

**Figura 23** – Níveis de expressão de IL-4 pelas células  $CD8^+$  e  $CD8^-$  do baço de murganhos BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D), saudáveis (A, C) e infectados (B, D), aos 30 e 45 dias após a inoculação dos parasitas.



Nos murganhos BALB/c com 30 dias de infecção, a expressão de IL-4 mostrou-se elevada nas células CD8<sup>+</sup> (P=0,039) e nas células CD8<sup>-</sup> (P=0,023) estimuladas pelo Ag e pelas três fracções proteicas. No dia 45 p.i. apenas as células CD8<sup>+</sup> exibiram níveis significativos desta citocina, quando cultivadas na presença das fracções High (P=0,046) e Inter (P=0,032) (Fig.23B).

Nos murganhos C57BL/6 a expressão de IL-4 foi sempre reduzida em todas as situações estudadas e muito semelhante ao observado nos animais saudáveis (Fig. 23C, D).

## **2.4 Indução da produção de citocinas pelas fracções proteicas**

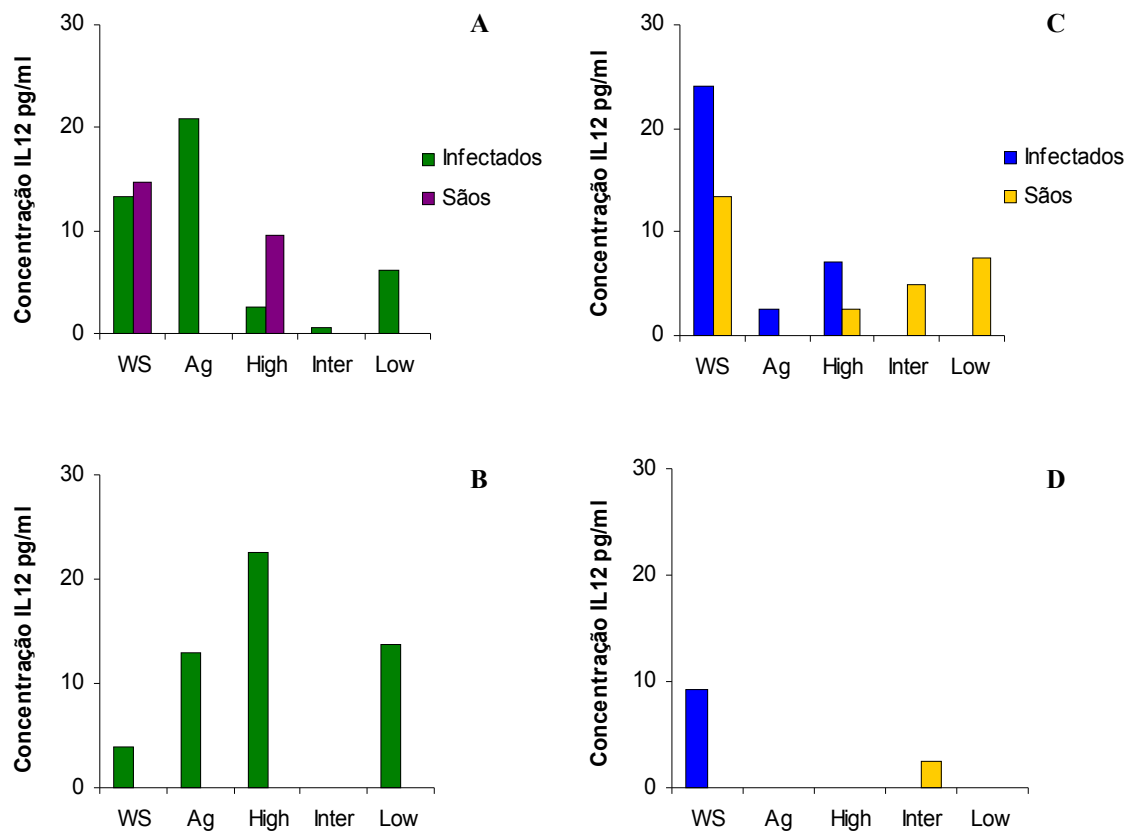
### **2.4.1 – Linfócitos totais**

#### **2.4.1.1 – IL-12**

No início da infecção (dia 30 p.i.) os linfócitos estimulados e não estimulados do baço da estirpe de murganhos BALB/c produziram IL-12, sendo esta superior em células estimuladas pelo Ag (Fig. 24A). A estimulação com os grupos de fracções proteicas não aumentou a produção de IL-12. Com o aumento da carga parasitária esta citocina foi detectada em significativamente maior quantidade nos sobrenadantes das células estimuladas com as fracções High (P=0,016) e Low (P=0,017) (Fig 24 B).

Nos murganhos C57BL/6, a produção de IL-12 nas células estimuladas do baço, de animais saudáveis ou de animais infectados, foi reduzida ou indetectável (Fig. 24 C, D). Contudo, no dia 30 p.i. as células não estimuladas produziram quantidades consideráveis desta citocina.

**Figura 24** - Produção de IL-12 pelas células do baço de murganhos BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D) aos dias 30 (A, C) e 45 (B, D) após a inoculação dos parasitas.



#### 2.4.1.2 - $IFN\gamma$

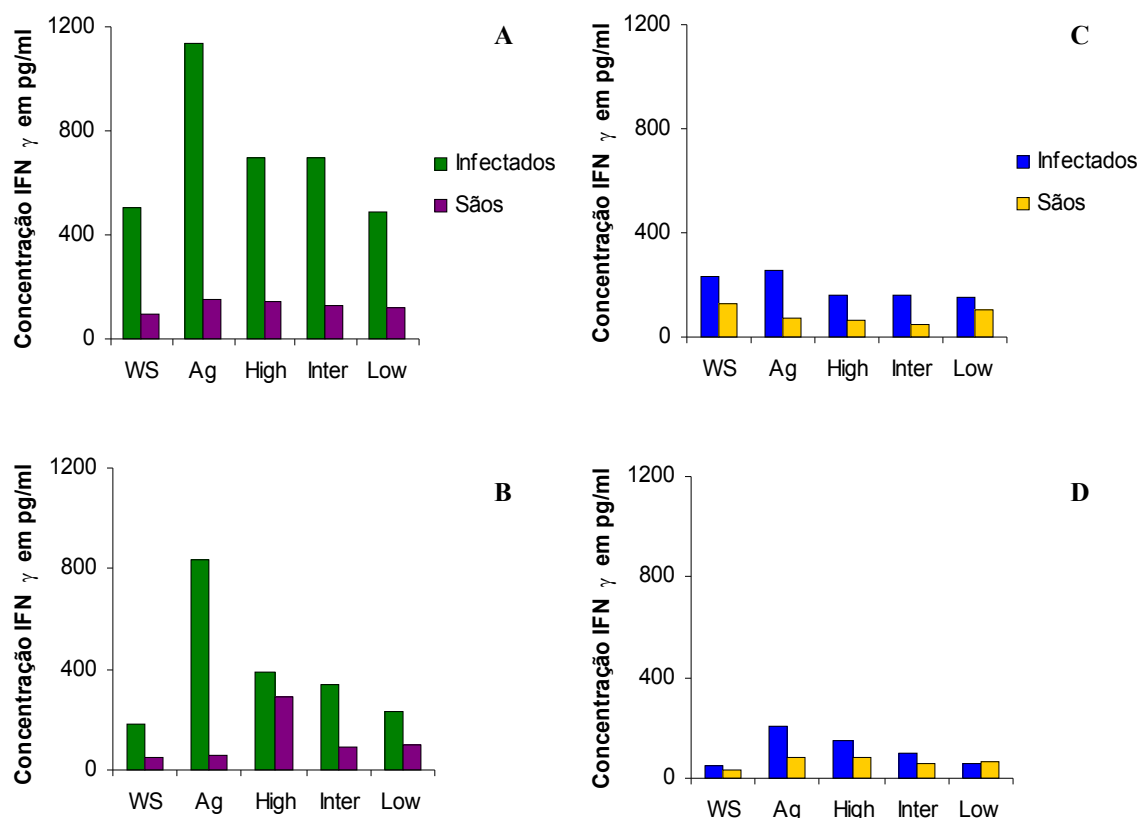
Os linfócitos não estimulados dos murganhos BALB/c produziram quantidades consideráveis de  $IFN\gamma$  no dia 30 p.i. Na presença de estimulação adicional verificou-se um acréscimo de produção desta citocina nos BALB/c. Este aumento foi significativo ( $P=0,016$ ) em células estimuladas com Ag. A produção de  $IFN\gamma$  diminuiu significativamente ( $P=0,001$ ) com o aumento da carga parasitária independentemente das células serem estimuladas ou não. Não se observaram diferenças significativas na produção de  $IFN\gamma$  pelas células estimuladas pelas três fracções proteicas (Fig. 25A, B).

Os linfócitos totais dos murganhos C57BL/6 produziram pequenas quantidades de  $IFN\gamma$  durante o decurso da infecção, independentemente de terem sido ou não estimulados



(Fig. 25 C, D), tendo-se observado-se uma ligeira diminuição da produção de IFN $\gamma$  no dia 45 de colheita relativamente ao dia 30.

**Figura 25** – Produção de IFN $\gamma$  pelos linfócitos do baço de murganhos BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D) aos dias 30 (A, C) e 45 (B, D) após a inoculação dos parasitas.



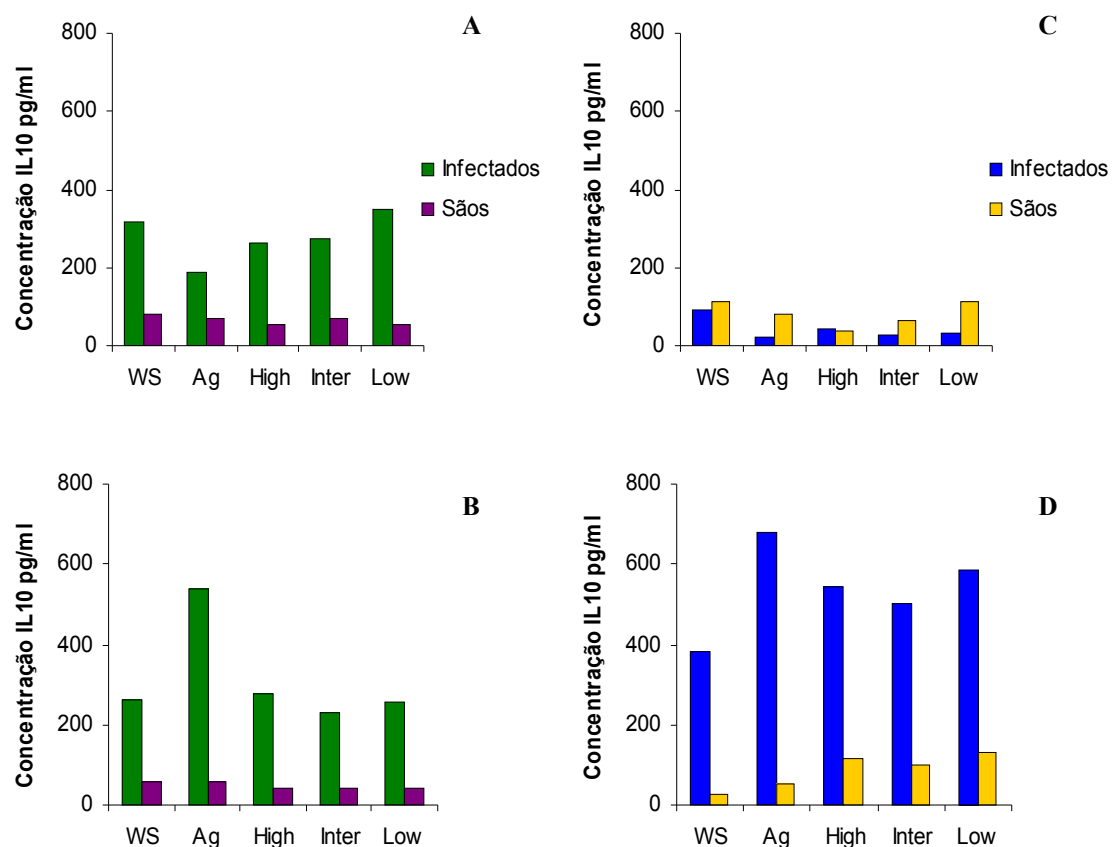
De um modo geral, a produção de IFN $\gamma$  foi superior nas células do baço de murganhos BALB/c do que nas dos murganhos C57BL/6. Também nesta estirpe não se observaram diferenças significativas na produção de IFN $\gamma$  pelas células estimuladas pelas três fracções proteicas.

#### 2.4.1.3 – IL-10

A IL-10 foi produzida por linfócitos não estimulados do baço dos murganhos BALB/c e C57BL/6 infectados, nos dois dias de colheita. A adição de estimulação não aumentou a

produção de IL-10 no dia 30 após inoculação dos parasitas (Fig. 26A). No dia 45 de infecção, em que a carga parasitária foi superior nos BALB/c, apenas se verificou um aumento de produção de IL-10 pelas células do baço estimuladas pelo Ag (Fig. 26B).

**Figura 26** - Produção de IL-10 por linfócitos do baço de murganhos BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D) aos dias 30 (A, C) e 45 (B, D) após a inoculação dos parasitas.



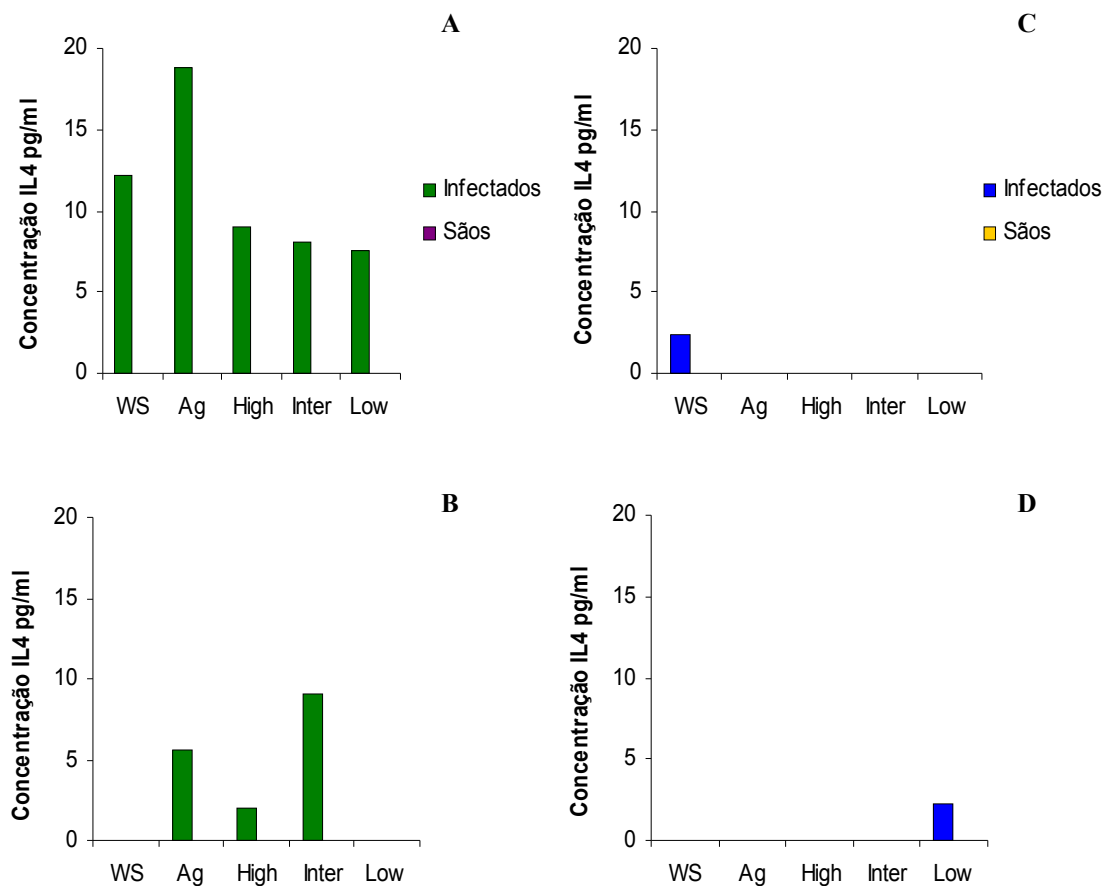
No dia 30 p.i., as células mononucleares do baço dos murganhos C57BL/6 apresentaram uma produção de IL-10 idêntica ou inferior à detectada nos animais saudáveis, independentemente de terem sido ou não estimuladas (Fig. 26C).

No entanto, no dia 45 de infecção, em que se verificou uma diminuição da carga parasitária, as células estimuladas apresentaram um aumento significativo de IL-10 ( $P=0,000$ ), (Fig. 26D).

#### 2.4.1.4 – IL-4

No dia 30 de infecção os linfócitos do baço da estirpe de murganhos BALB/c produziram quantidades apreciáveis de IL-4, que atingiram níveis superiores em células estimuladas pelo Ag. A estimulação com as fracções proteicas não aumentou a produção de IL-4, parecendo ter ocorrido inibição (Fig. 27A).

**Figura 27** - Produção de IL-4 pelos linfócitos do baço de murganhos BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D) aos dias 30 (A, C) e 45 (B, D) após a inoculação dos parasitas.



Com o aumento da carga parasitária (45 dias p.i.) a IL-4 deixou de ser detectada nos sobrenadantes das células não estimuladas (WS) e estimuladas com a fracção Low, enquanto que as células estimuladas com Ag ou com a fracção proteica High apresentaram diminuição da produção de IL-4 (Fig. 27B).

Nos murganhos C57BL/6, apenas se detectou produção de IL-4 pelas células não estimuladas (Fig. 27C) e estimuladas com a fracção Low (Fig. 26D) do baço dos animais infectados, respectivamente no dia 30 p.i. e 45 p.i.

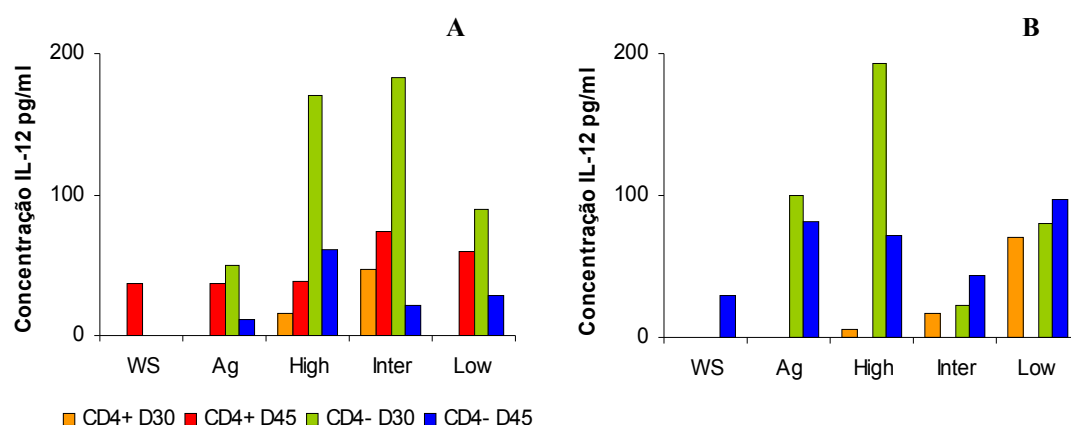
#### 2.4.2 – Células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup>

##### 2.4.2.1 - IL-12

As células dos animais saudáveis de ambas as estirpes não produziram IL-12.

No dia 30 de infecção as células CD4<sup>-</sup> do baço da estirpe de murganhos BALB/c estimuladas pelo Ag produziram IL-12. Porém, quando estimuladas pelas fracções proteicas High (P=0,012) e Inter (P=0,011) a quantidade libertada para o meio de cultura aumentou significativamente. As células CD4<sup>+</sup> estimuladas com as fracções High e Inter apresentaram também libertação significativa (P<sub>High</sub>=0,034; P<sub>Inter</sub>=0,014) de IL-12. Com o aumento da carga parasitária, observou-se uma diminuição dos níveis de IL-12 detectada nos sobrenadantes das células CD4<sup>-</sup> apesar da quantidade induzida pela fracção High continuar a ser significativa (P=0,045). As células CD4<sup>+</sup> estimuladas pelas fracções Inter (P=0,037) e Low (P=0,042) revelaram um considerável aumento de produção (Fig. 28A).

**Figura 28** – Produção de IL-12 pelas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) aos dias 30 e 45 após a inoculação dos parasitas.

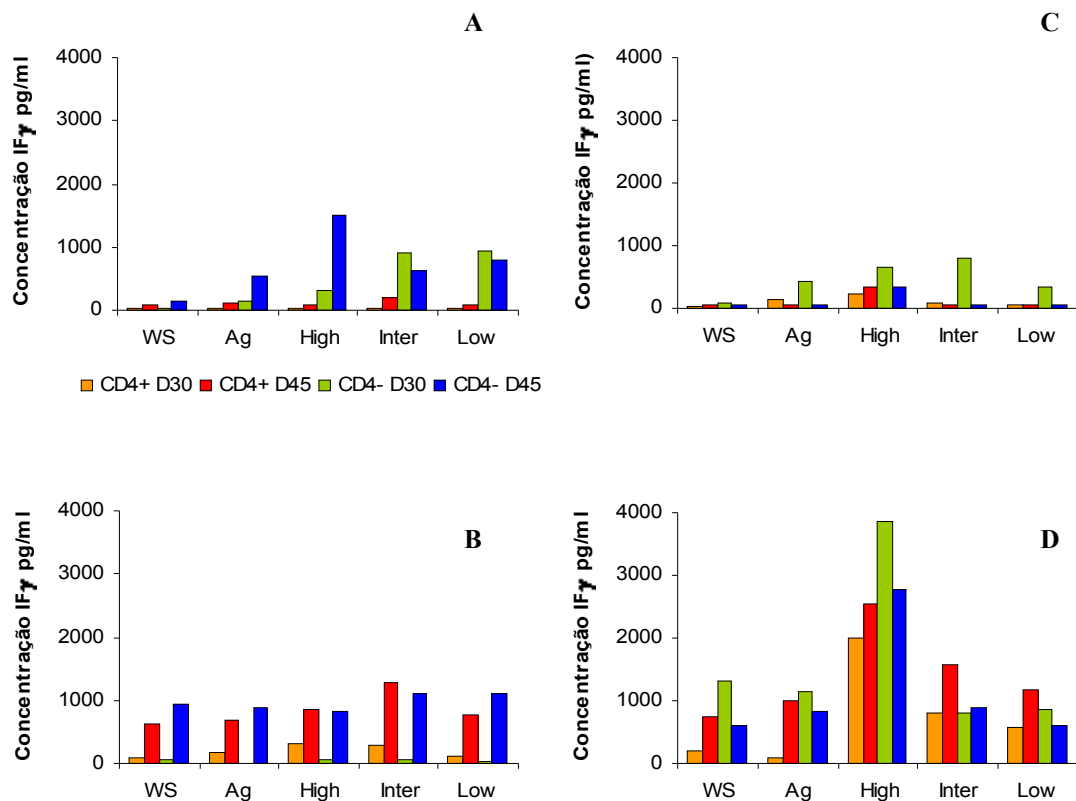


Nos murganhos C57BL/6, a produção de IL-12 foi detectada em maior quantidade nas células CD4<sup>+</sup> do baço, estimuladas pela fracção proteica High (P=0,022), no dia 30 de colheita. No entanto, embora em menor quantidade, esta citocina também foi detectada nas células CD4<sup>+</sup> quando estimuladas pelas três fracções proteicas. No dia 45 de colheita, com a diminuição da carga parasitária, as quantidades de IL-12 produzidas pelas células CD4<sup>+</sup>, quando estimuladas pelos diferentes antígenos diminuíram ou mantiveram-se semelhantes ao produzido no dia 30 p.i. (Fig. 28B).

#### 2.4.2.2 - IFN $\gamma$

*In vitro*, ambas as subpopulações de células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> não estimuladas de murganhos BALB/c infectados produziram IFN $\gamma$ .

**Figura 29** – Produção de IFN $\gamma$  pelas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> do baço de murganhos BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D) saudáveis (A, C) e infectados (B, D), aos dias 30 e 45 após a inoculação dos parasitas.



Verificou-se maior produção pelas células CD4<sup>+</sup> no dia 45 p.i., porém, a estimulação, com os diferentes antígenos, não induziu um aumento significativo da sua produção (Fig. 29A).

Em ambos os dias de colheita, o grupo de fracções proteicas High estimulou fortemente a produção de IFN $\gamma$  (Fig. 29D), nas células CD4<sup>+</sup> (P=0,026) e CD4<sup>-</sup> (P=0,016) de murganhos C57BL/6 infectados. Os animais saudáveis desta estirpe mostraram baixos níveis de produção desta citocina (Fig. 29C).

#### 2.4.2.3 - IL-10

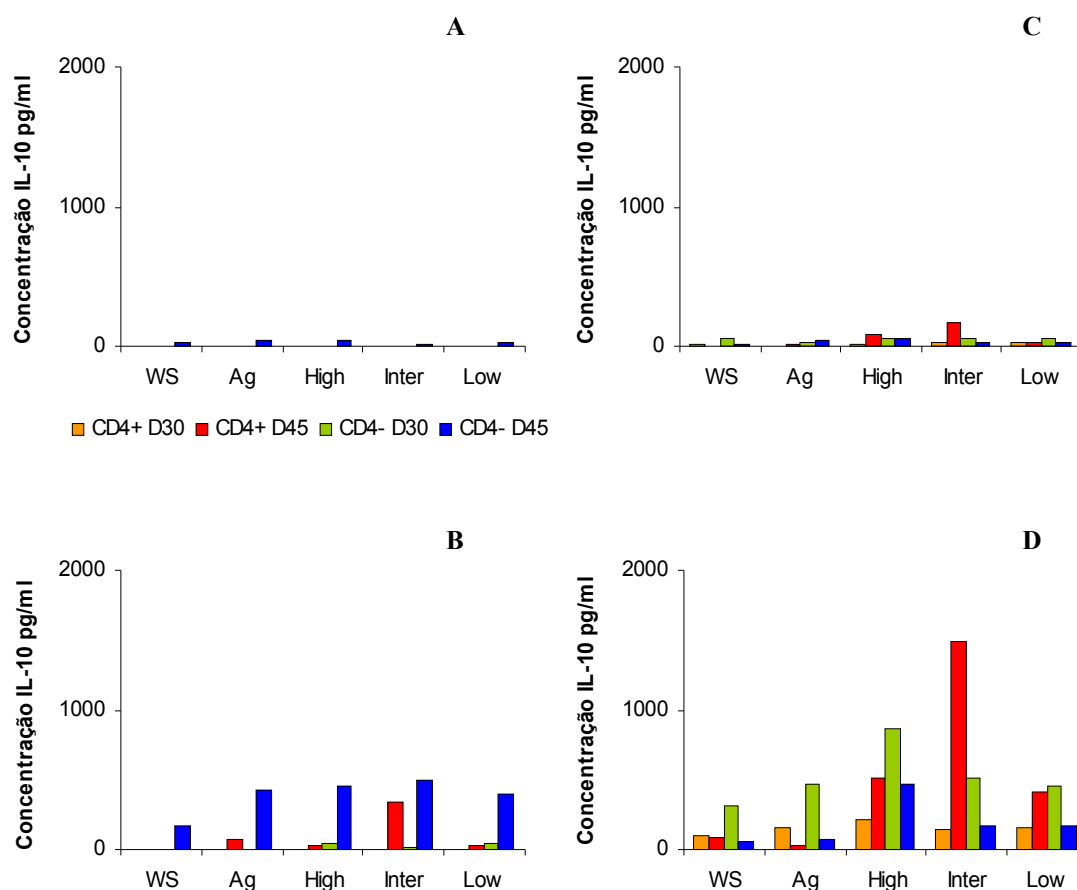
As células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> não estimuladas do baço de murganhos BALB/c saudáveis não produziram IL-10 enquanto que as células CD4<sup>-</sup> libertaram pequenas quantidades desta citocina (Fig. 30A).

Nos animais infectados desta estirpe a adição de estimulação não aumentou substancialmente a produção de IL-10 no dia 30 p.i. No dia 45 de infecção, verificou-se um aumento de produção de IL-10 pelas células CD4<sup>-</sup> do baço, quando estimuladas pelo Ag e pelas fracções proteicas, bem como pelas células CD4<sup>+</sup> induzidas pela fracção Inter (Fig. 30B).

As células dos murganhos C57BL/6 saudáveis, quando estimuladas pelas fracções proteicas ou pelo Ag, não revelaram aumentos consideráveis na quantidade de IL-10 detectada (Fig. 30C).

Nos animais infectados, desta estirpe de murganhos, as células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> não estimuladas produziram IL-10. No dia 30 p.i., a adição das fracções proteicas não induziu aumento de produção desta citocina pelas células CD4<sup>+</sup>. Porém, as células CD4<sup>-</sup> apresentaram um aumento na libertação de IL-10, que foi superior quando estas foram estimuladas pela fracção High (p=0,047). No dia 45 de infecção, em que se verificou uma diminuição da carga parasitária, a produção de IL-10 pelas células CD4<sup>+</sup>, aumentou, sobretudo quando estimuladas pela fracção Inter (p=0,040), (Fig. 30D).

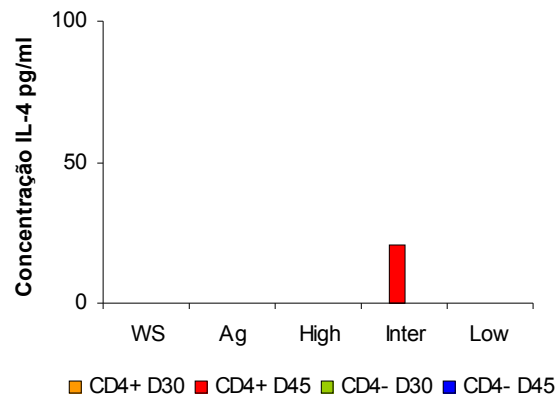
**Figura 30** – Produção de IL-10 pelas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganhos saudáveis (A, C) e infectados (B, D), BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D) aos dias 30 e 45 após a inoculação dos parasitas.



#### 2.4.2.4 - IL-4

As células dos murganhos BALB/c saudáveis e infectados não produziram IL-4 na presença ou ausência de estimulação. Nos murganhos C57BL/6, também não se detectou a produção de IL-4 nas diferentes subpopulações de células tanto na presença como na ausência de estimulação, quer em animais saudáveis, quer em animais infectados. Excepto no caso das células CD4<sup>+</sup> de animais infectados, estimuladas com a fracção Inter, no dia 45 de observação (Fig. 31), que libertaram uma quantidade apreciável de IL-4.

**Figura 31** – Produção de IL-4 pelas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganhos C57BL/6 infectados aos dias 30 e 45 após a inoculação dos parasitas.



#### 2.4.3 – Células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup>

##### 2.4.3.1 - IL-12

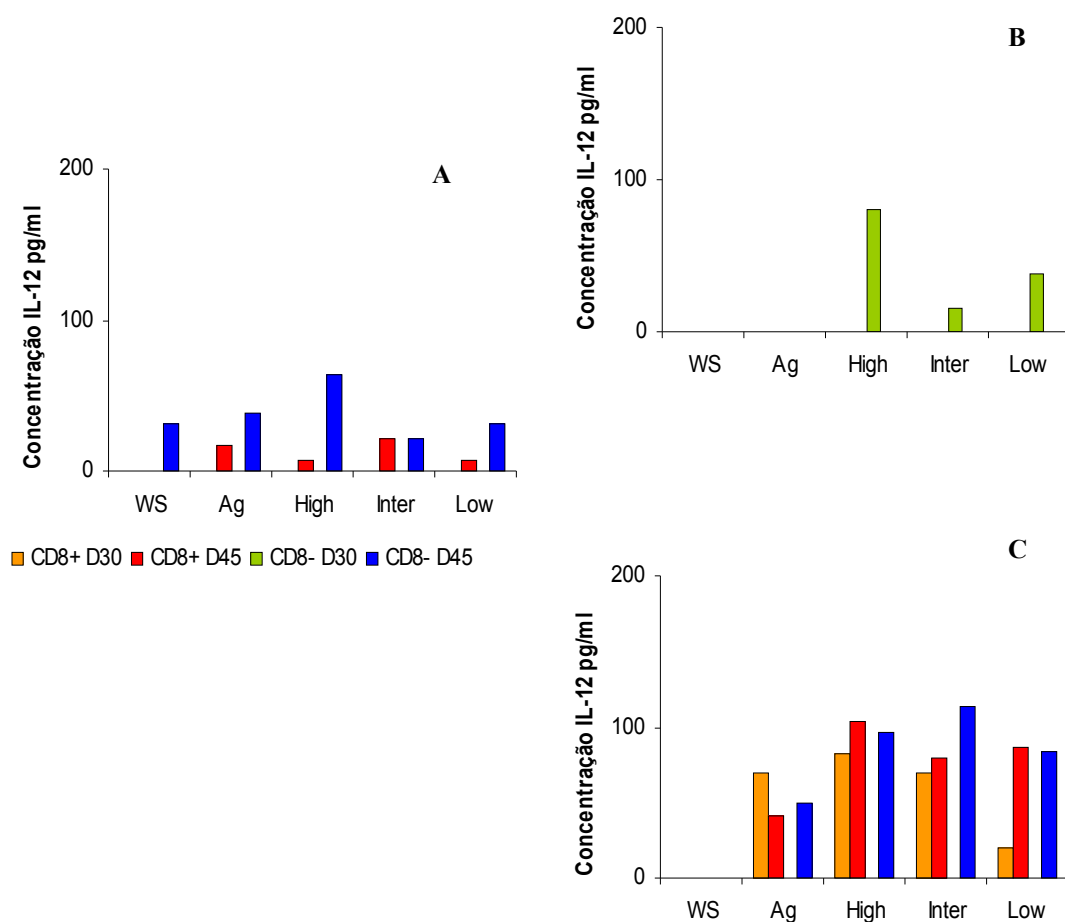
As células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> dos murganhos BALB/c saudáveis e infectados não revelaram produção de IL-12 no dia 30 de colheita.

Somente, no dia 45 de infecção, esta citocina passou a ser produzida pelas subpopulações CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup>, ainda que em quantidades reduzidas, quando estimuladas pelo Ag e pelas fracções antigénicas. As células CD8<sup>-</sup> não estimuladas também apresentaram uma pequena produção de IL-12 (Fig. 32A).

As células CD8<sup>+</sup> dos murganhos C57BL/6 controlo revelaram alguma libertação desta citocina quando estimuladas pelas fracções proteicas, no dia 30 de colheita (Fig. 32B). Nos murganhos C57BL/6 infectados, a produção de IL-12 foi detectada nas células CD8<sup>+</sup> estimuladas dos dias 30 e 45 p.i. As células CD8<sup>-</sup> só apresentaram libertação de IL-12 ao dia 45 p.i., quando estimuladas pelos diferentes antígenos (Fig. 32C).



**Figura 32** – Produção de IL-12 pelas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c (A) e C57BL/6 (B, C) saudáveis (B) e infectados (A, C), aos dias 30 e 45 após a inoculação dos parasitas.



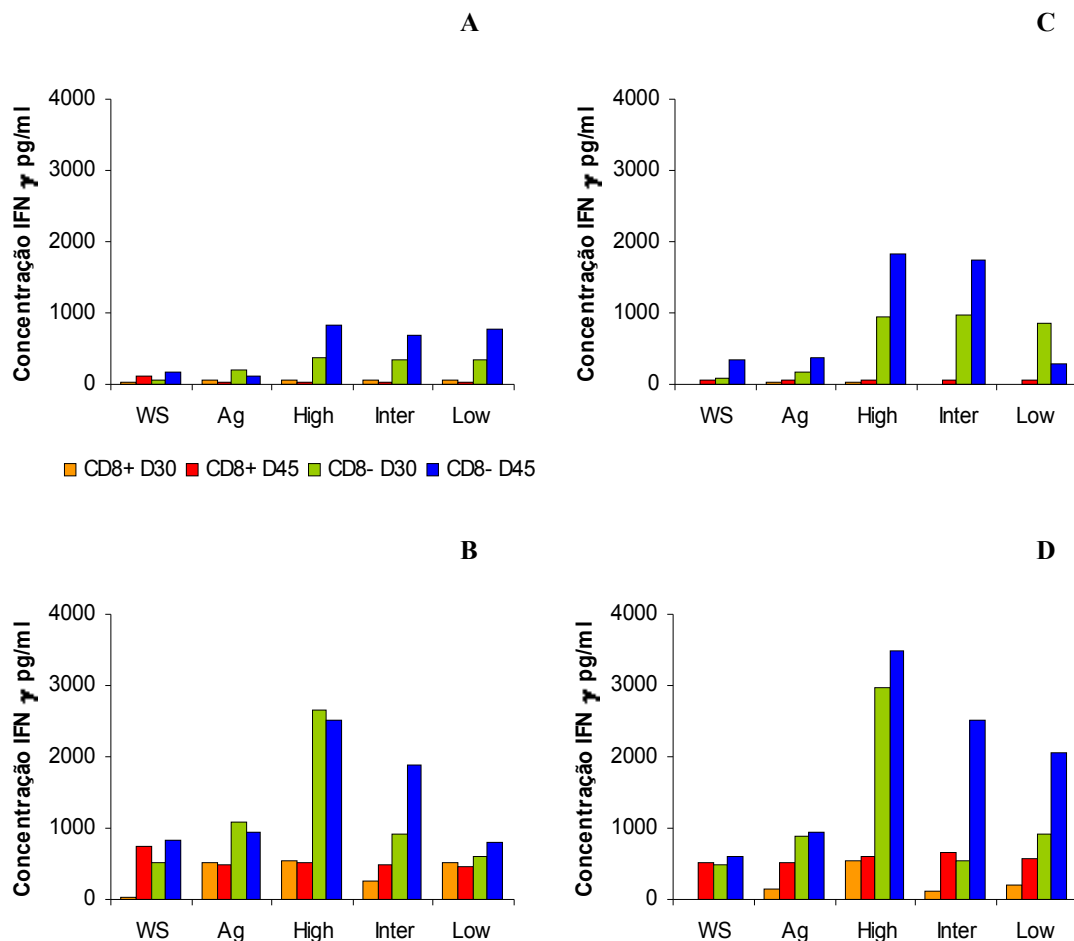
#### 2.4.3.2 - IFN $\gamma$

Nos murganhos BALB/c saudáveis as quantidades de IFN $\gamma$  produzidas pelas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> foram sempre reduzidas (Fig.33A). Nos animais infectados verificou-se produção de IFN $\gamma$ , significativamente superior ( $P=0,037$ ) pelas células CD8<sup>-</sup> estimuladas pela fracção High, nos dois dias de observação (Fig. 33B).

Nos murganhos C57BL/6 observou-se, de um modo geral, um aumento da produção de IFN $\gamma$  no dia 45 de colheita relativamente ao dia 30, independentemente de as células

serem ou não estimuladas. No dia 30 p.i., a fracção proteica High estimulou fortemente a produção de IFN $\gamma$  pelas células CD8 $^+$  (P=0,032). No dia 45, verificou-se ainda que as células CD8 $^+$  apresentaram um aumento da produção de IFN $\gamma$ , quando estimuladas pelas três fracções proteicas (P=0,040), (Fig. 33D). Os animais saudáveis apresentaram, de um modo geral, reduzida produção de IFN $\gamma$ . A quantidade libertada desta citocina só foi superior nas células CD8 $^+$  estimuladas pelas fracções High e Inter (Fig. 33C).

**Figura 33** – Produção de IFN $\gamma$  pelas células CD8 $^+$  e CD8 $^+$  do baço de murganhos BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D) saudáveis (A, C) e infectados (B, D), aos dias 30 e 45 após a inoculação dos parasitas.

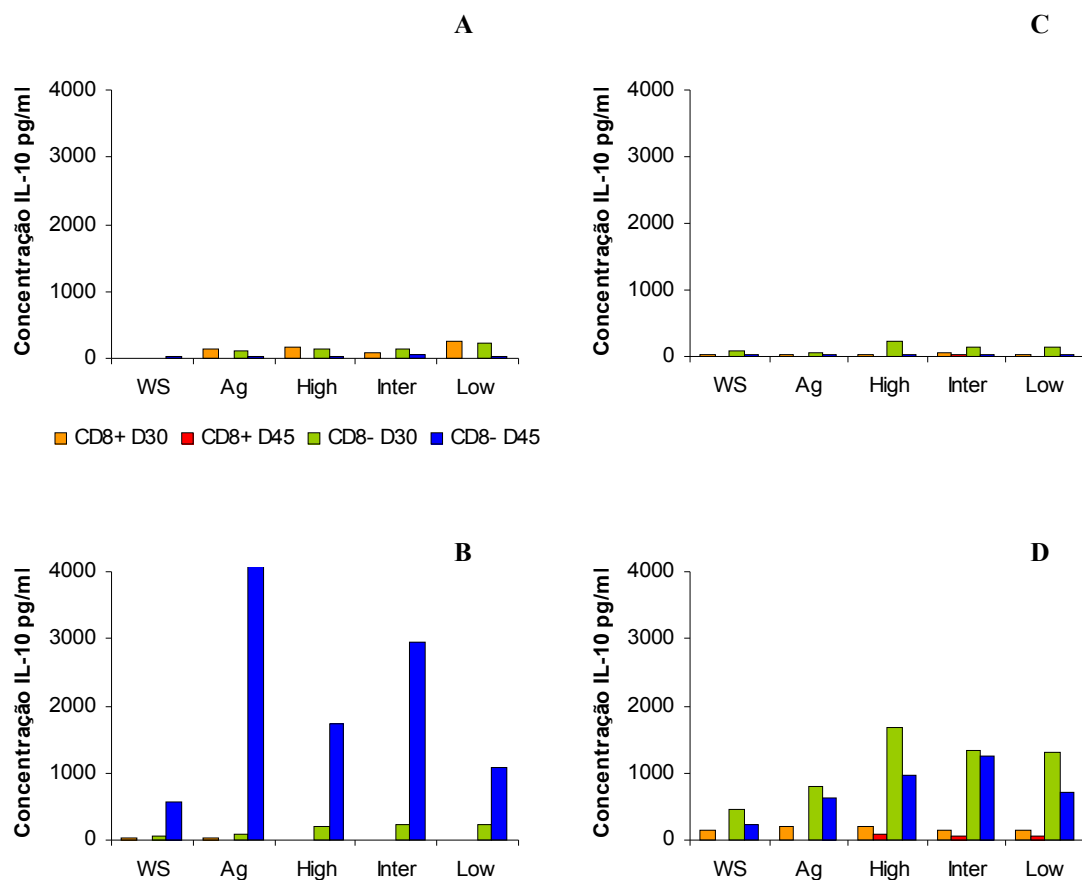


### 2.4.3.3 – IL-10

As células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> de murganhos saudáveis não produziram ou produziram reduzidíssimos níveis de IL-10 (Fig.34A, C).

As quantidades de IL-10 produzidas pelas células não estimuladas do baço dos murganhos BALB/c e C57BL/6 infectados foram reduzidas ou indetectáveis, em ambos os dias de colheita. A adição de estimulação não aumentou substancialmente a produção de IL-10 no dia 30 após inoculação dos parasitas, nos murganhos BALB/c. Porém, no dia 45 de infecção, em que a carga parasitária foi superior, verificou-se um aumento de produção de IL-10 pelas células CD8<sup>-</sup>, do baço, quando estimuladas pelo Ag (P=0,017) e pelas fracções proteicas em estudo (P=0,036) (Fig. 34B).

**Figura 34** – Produção de IL-10 pelas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c (A, B) e C57BL/6 (C, D) saudáveis (A, C) e infectados (B, D), aos dias 30 e 45 após a inoculação dos parasitas.



Nos murganhos C57BL/6, foram as células CD8<sup>+</sup> as que apresentaram maior produção de IL-10 ( $P_{30}=0,048$ ;  $P_{45}=0,049$ ), quando estimuladas pelas diferentes fracções proteicas, em ambos os dias de colheita (Fig. 33D).

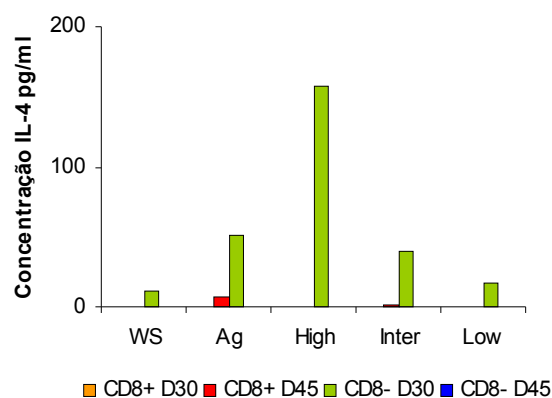
#### 2.4.3.4 – IL-4

Nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de murganhos saudáveis não foi detectada IL-4.

No dia 30 de infecção, apenas as células CD8<sup>+</sup> do baço da estirpe de murganhos BALB/c infectados produziram quantidades apreciáveis de IL-4, sendo esta superior quando estimuladas pelo grupo High ( $P=0,040$ ). Com o aumento da carga parasitária (dia 45 p.i.) a IL-4 deixou de ser detectada nos sobrenadantes das células CD8<sup>+</sup>, enquanto que as células CD8<sup>+</sup>, estimuladas com Ag e grupo Inter, apresentaram uma reduzida produção de IL-4 (Fig. 35).

Nos murganhos C57BL/6 infectados, não se detectou a produção de IL-4 nas diferentes subpopulações das células do baço estimuladas ou não estimuladas

**Figura 35** – Produção de IL-4 pelas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do baço de murganhos BALB/c infectados aos dias 30 e 45 após a inoculação dos parasitas.

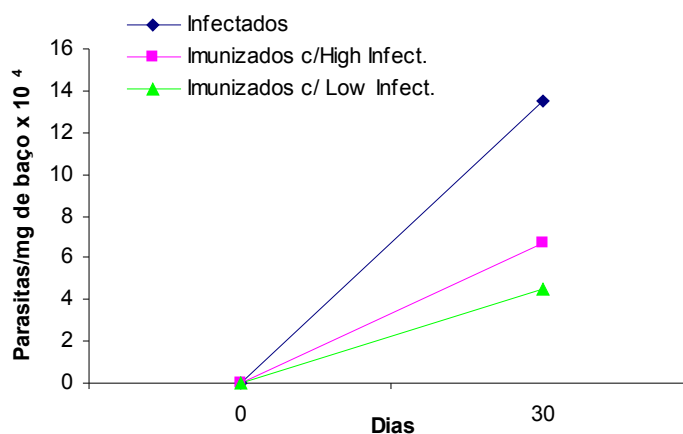


### 3. Imunização de murganhos BALB/c com as fracções proteicas High e Low

#### 3.1 Densidade Parasitária

Neste estudo, verificou-se uma redução da carga parasitária nos animais imunizados e infectados quando comparados com murganhos infectados e não imunizados. Esta redução foi de 50,4% nos murganhos imunizados com as fracções High e de 66,9% nos imunizados com as fracções Low (Fig. 36) um mês após a infecção.

**Figura 36** - Carga parasitária observada no baço de murganhos imunizados com as fracções High e Low, ao dia 30 p.i.



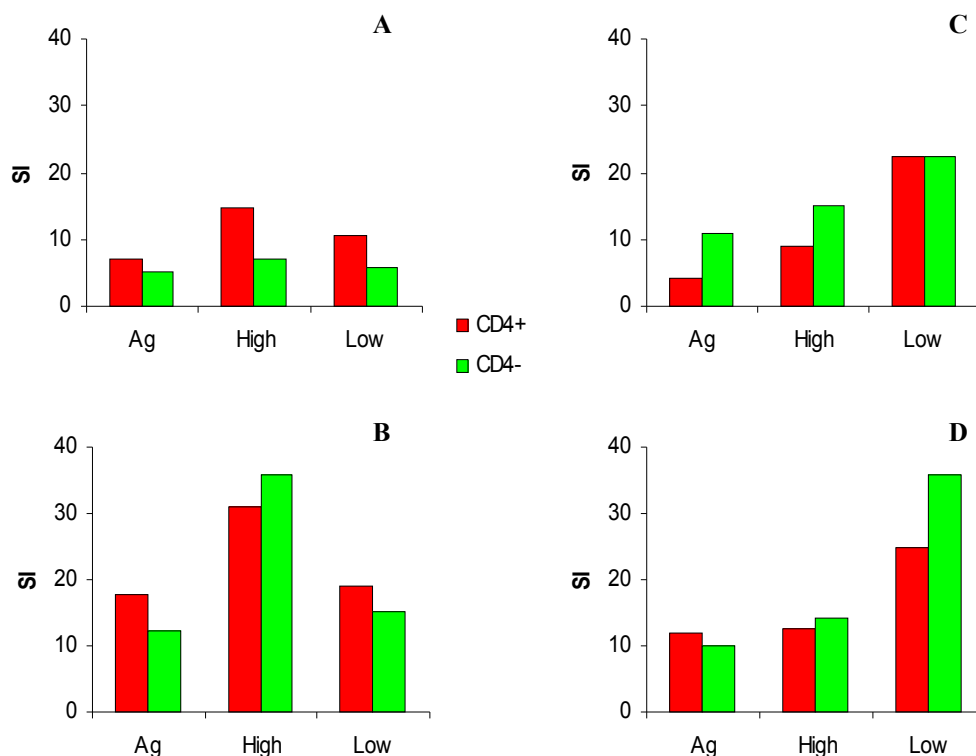
#### 3.2 Proliferação Linfocitária

##### 3.2.1 Células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup>

As células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço dos animais imunizados mostraram capacidade de multiplicação na presença dos antígenos utilizados, tendo as células dos animais imunizados com a fracção Low atingido níveis elevados (Fig. 37C). Nos murganhos

imunizados com a fracção High e infectados, o índice de estimulação foi significativamente maior nas células CD4<sup>+</sup> (P=0,045) e CD4<sup>-</sup> (P=0,044), estimuladas por esta fracção (Fig. 37B). Do modo idêntico, nos animais imunizados com a fracção Low e infectados as células CD4<sup>+</sup> (P=0,044) e CD4<sup>-</sup> (P=0,042) estimuladas com a mesma fracção, apresentaram valores elevados de proliferação (Fig. 37D).

**Figura 37** – Índices de estimulação das células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> de murganhos BALB/c imunizados com as fracções High (A, B) e Low (C, D) não infectados (A, C) e infectados com promastigotas de *L. infantum* (B, D). As células foram estimuladas *in vitro* com Ag e as fracções High e Low.

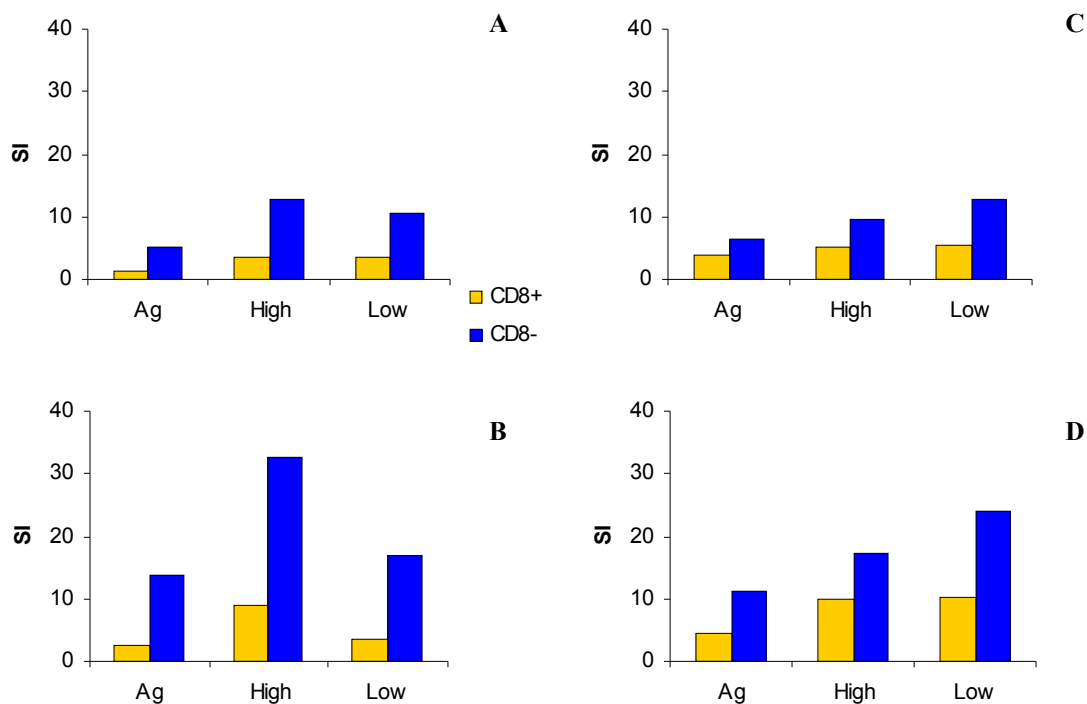


### 3.2.2 Células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup>

As células CD8<sup>-</sup> mostraram maior capacidade de multiplicação em relação às células CD8<sup>+</sup> em todos os casos estudados. O índice de estimulação foi significativamente

maior nas células CD8<sup>-</sup> dos murganhos imunizados com a fracção High e infectados (P=0,046), quando estimulados com esta fracção (Fig. 38B) e dos animais imunizados com a fracção Low e infectados (P=0,049), quando estimuladas com a mesma fracção (Fig. 38D).

**Figura 38** – Índices de estimulação das células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> de murganhos BALB/c imunizados com as fracções High (A, B) e Low (C, D) não infectados (A, C) e infectados com promastigotas de *L. infantum* (B, D). As células foram estimuladas *in vitro* com Ag e as fracções High e Low.

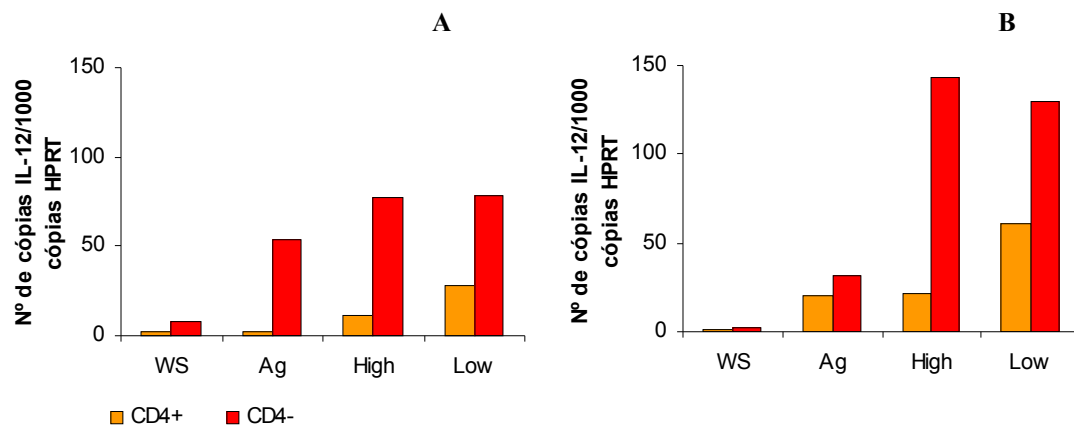


### 3.3 Expressão de Citocinas

#### 3.3.1 Células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> de murganhos BALB/c imunizados com a fracção proteica High

Observou-se um aumento do número de cópias de IL-12 nas células CD4<sup>+</sup> dos animais imunizados com a fracção High e imunizados e infectados (Fig. 39A, B) quando estimuladas com a fracção Low. A expressão de IL-12 foi consideravelmente maior nas células CD4<sup>-</sup> dos animais infectados quando estimuladas com as fracções High (P=0,030) e Low (P=0,032).

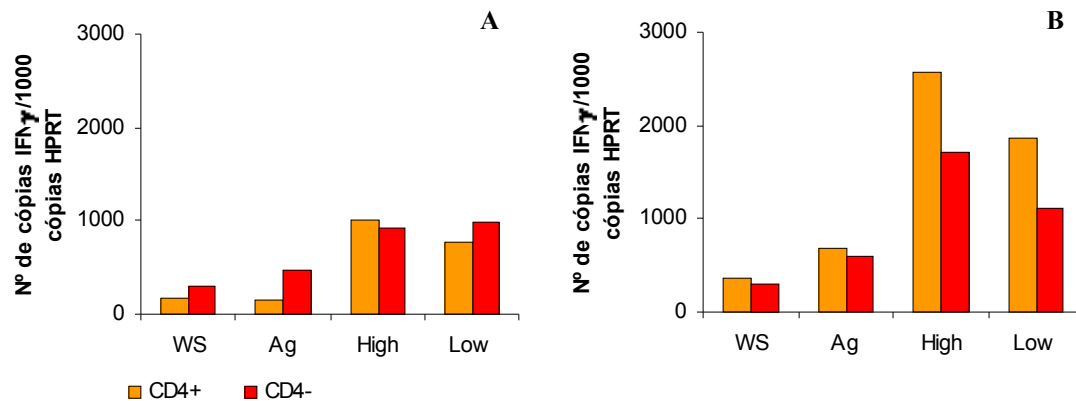
**Figura 39** - Níveis de expressão de IL-12 nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção High (A) e imunizados e infectados (B).



As fracções High e Low induziram um considerável aumento de mRNA de IFN $\gamma$  nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> dos animais imunizados (Fig. 40A). Nos murganhos imunizados e infectados as células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> apresentaram um aumento significativo da expressão de IFN $\gamma$  quando estimuladas pelas fracções High ( $P_{CD4^+}=0,032$ ;  $P_{CD4^-}=0,042$ ) e Low ( $P_{CD4^+}=0,036$ ;  $P_{CD4^-}=0,048$ ), em comparação com as células não estimuladas ou estimuladas com Ag (Fig. 40B).



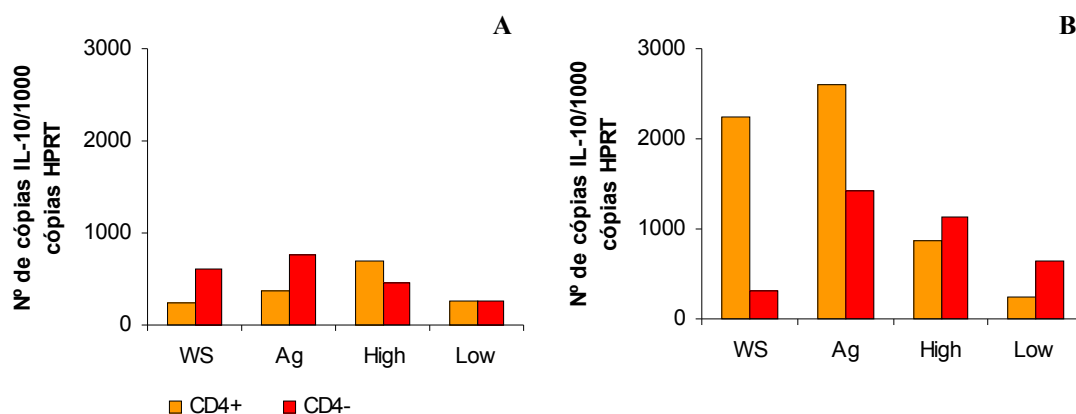
**Figura 40** - Níveis de expressão de IFN $\gamma$  nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganinhos BALB/c imunizados com a fracção High (A) e imunizados e infectados (B).



As células CD4<sup>+</sup> estimuladas com as fracções High e Low dos murganinhos imunizados e infectados mostraram uma redução significativa ( $P_{\text{High}}=0,026$ ,  $P_{\text{Low}}=0,017$ ) da expressão de IL-10, quando comparada com as células não estimuladas e estimuladas com Ag (Fig. 41B), atingindo valores próximos dos observados nas células CD4<sup>+</sup> dos animais imunizados estimuladas com as fracções High e Low (Fig. 41A).

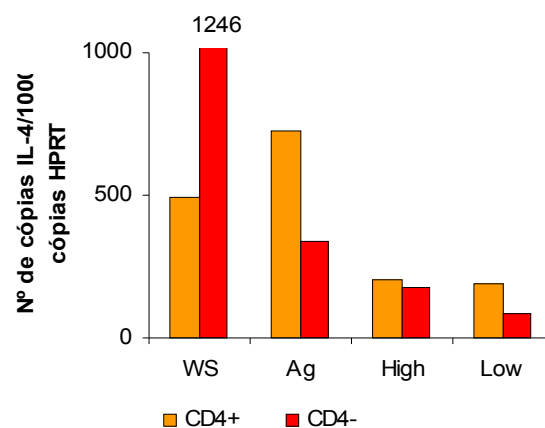
Contudo a expressão desta citocina sofreu aumento nas células CD4<sup>-</sup> estimuladas pelas fracções proteicas quando comparadas com as células não estimuladas dos animais infectados e com as células dos murganinhos imunizados estimuladas pelas fracções proteicas

**Figura 41** - Níveis de expressão de IL-10 nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganinhos BALB/c imunizados com a fracção High (A) e imunizados e infectados (B).



A expressão de IL-4 pelas células dos murganhos imunizados foi sempre reduzida (menor que nove cópias de mRNA de IL-4/1000 cópias de HPRT). Nos animais imunizados e infectados, verificou-se uma diminuição significativa da expressão de IL-4 nas células  $CD4^+$  ( $P_{High}=0,036$ ,  $P_{Low}=0,027$ ) e  $CD4^-$  ( $P_{High}=0,016$ ,  $P_{Low}=0,007$ ) estimuladas com as fracções High e Low, quando comparada com as células não estimuladas e estimuladas com Ag (Fig 42).

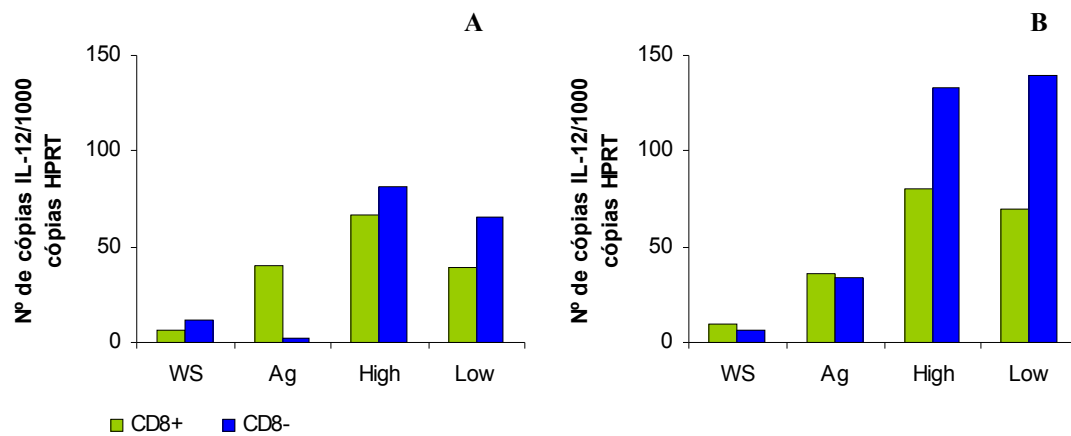
**Figura 42** - Níveis de expressão de IL-4 nas células  $CD4^+$  e  $CD4^-$  do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção High.



### 3.3.2 Células $CD8^+$ e $CD8^-$ de murganhos BALB/c imunizados com a fracção proteica High

Nos animais imunizados e infectados observou-se um aumento do número de cópias de IL-12 nas células  $CD8^+$  ( $P_{High}=0,037$ ,  $P_{Low}=0,039$ ) e  $CD8^-$  ( $P_{High}=0,033$ ,  $P_{Low}=0,032$ ) quando estimuladas com as fracções High e Low, em comparação com as mesmas células não estimuladas (Fig. 43 B).

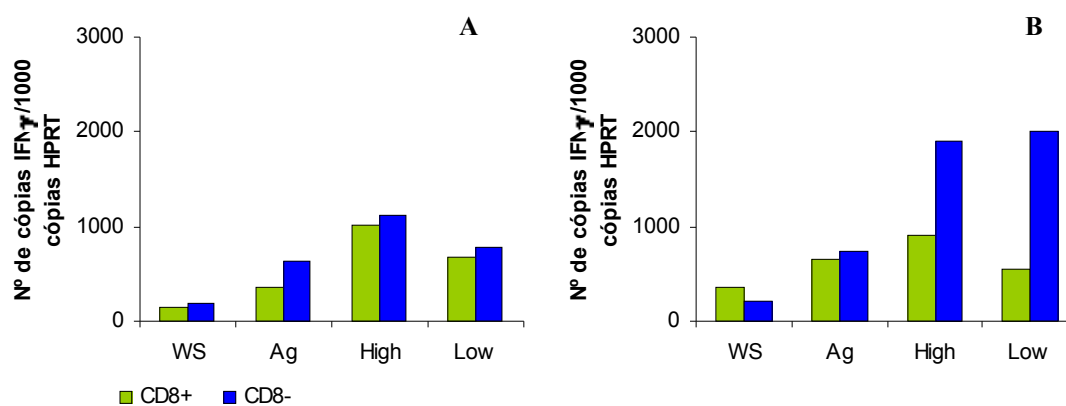
**Figura 43** - Níveis de expressão de IL-12 nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganinhos BALB/c imunizados com a fracção High (A) e imunizados e infectados (B).



Nas células CD8<sup>+</sup> estimuladas pelos grupos proteicos High e Low dos murganinhos imunizados, verificou-se um aumento da expressão de IFN $\gamma$  quando comparado com as não estimuladas (Fig 44A).

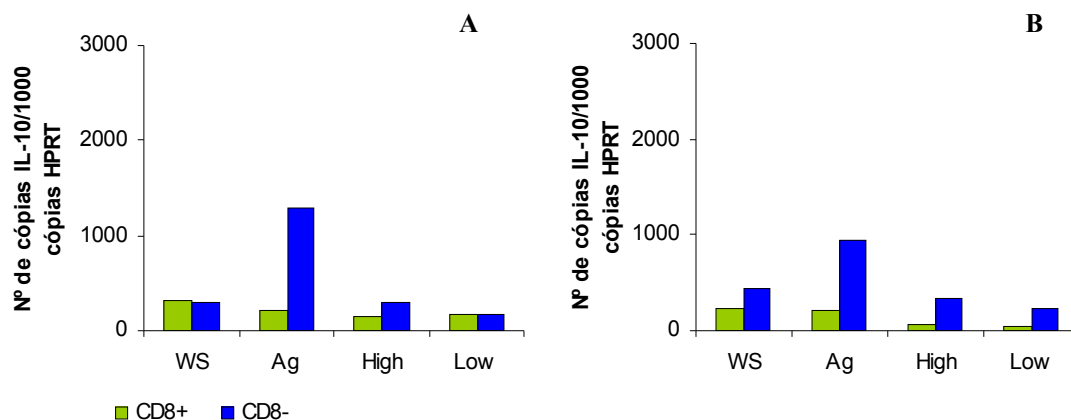
Nos animais imunizados e infectados a expressão desta citocina nas células CD8<sup>+</sup> foi semelhante ao observado nos animais imunizados em todos os casos estudados. No entanto, as fracções High e Low induziram aumento de mRNA de IFN $\gamma$  nas células CD8<sup>-</sup> dos animais saudáveis e um significativo incremento nos animais imunizados e infectados ( $P_{\text{High}}=0,039$ ,  $P_{\text{Low}}=0,040$ ) (Fig.44B).

**Figura 44** - Níveis de expressão de IFN $\gamma$  nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganinhos BALB/c imunizados com a fracção High (A) e imunizados e infectados (B).



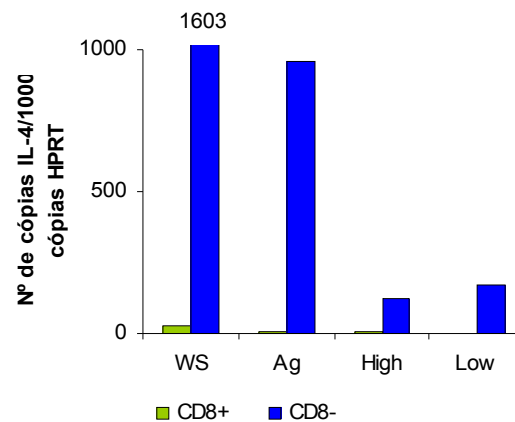
As células CD8<sup>+</sup> estimuladas com as fracções High e Low dos murganhos imunizados e imunizados e infectados mostraram redução significativa ( $P_{\text{High}}=0,047$ ,  $P_{\text{Low}}=0,043$ ) da expressão de IL-10, quando comparadas com as estimuladas com Ag. A expressão de IL-10 nas células CD8<sup>+</sup> estimuladas e não estimuladas foi idêntica nos animais saudáveis e nos animais infectados (Fig. 45A, B).

**Figura 45** - Níveis de expressão de IL-10 nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção High (A) e imunizados e infectados (B)



A expressão de IL-4 pelas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> dos murganhos imunizados e CD8<sup>+</sup> dos animais imunizados e infectados, foi sempre reduzida (inferior a 31 cópias de IL-4/1000 cópias de HPRT). Verificou-se uma diminuição significativa ( $P_{\text{High}}=0,009$ ,  $P_{\text{Low}}=0,012$ ) da expressão de IL-4 nas células CD8<sup>+</sup> estimuladas com as fracções High e Low dos animais imunizados e infectados, quando comparada com as células não estimuladas e estimuladas com Ag (Fig. 46).

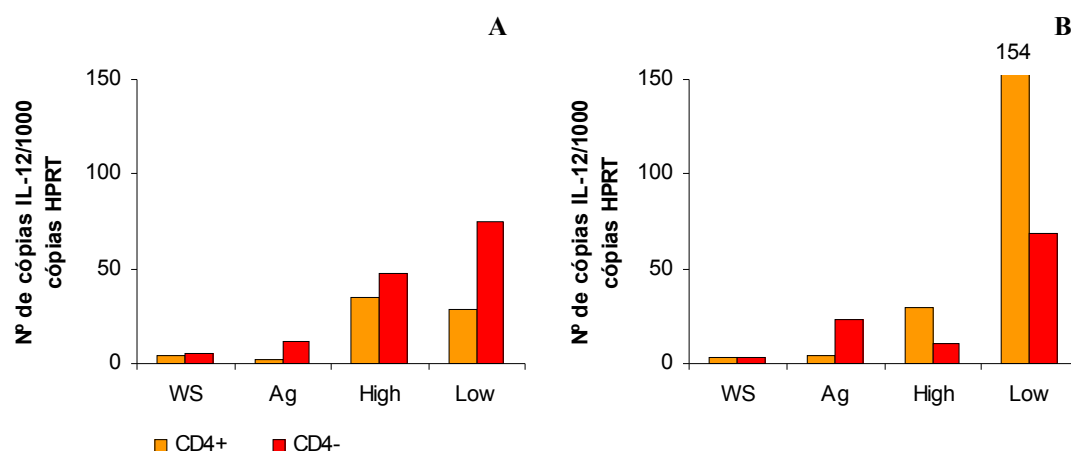
**Figura 46** - Níveis de expressão de IL-4 nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção High.



### 3.3.3 Células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> de murganhos BALB/c imunizados com a fracção proteica Low

Nos animais imunizados com a fracção proteica Low, as células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> estimuladas com as fracções High e Low apresentaram um aumento do número de cópias de IL-12 (Fig 47A) e de IFN $\gamma$  (Fig. 48A), em comparação com as mesmas células não estimuladas ou estimuladas com Ag.

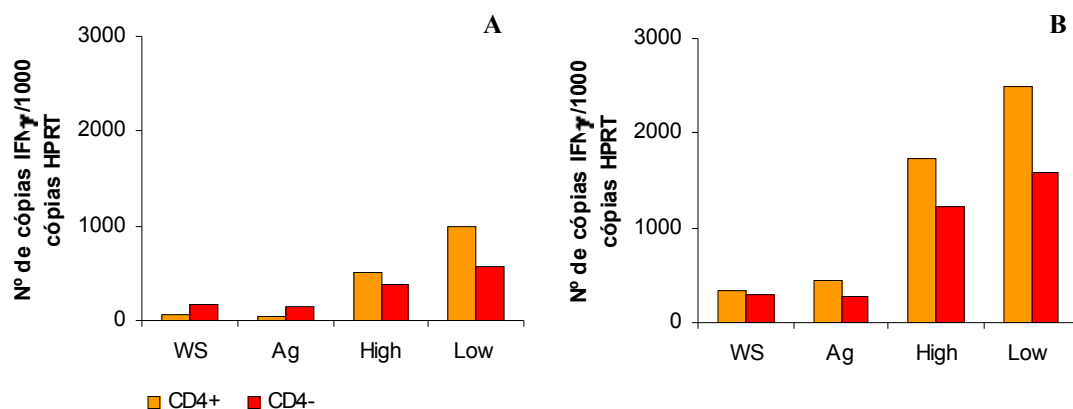
**Figura 47** - Níveis de expressão de IL-12 nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção Low (A) e imunizados e infectados (B).



Os murganhos imunizados e infectados apresentaram níveis significativamente elevados de mRNA de IL-12 nas células  $CD4^+$  e  $CD4^-$  estimuladas pela fracção Low ( $P_{CD4^+}=0,022$ ;  $P_{CD4^-}=0,042$ ). Contudo, o aumento verificado nas células  $CD4^-$  dos animais imunizados e infectados foi idêntico ao observado nas células  $CD4^+$  dos animais imunizados, quando estimuladas com a fracção Low (Fig. 47B).

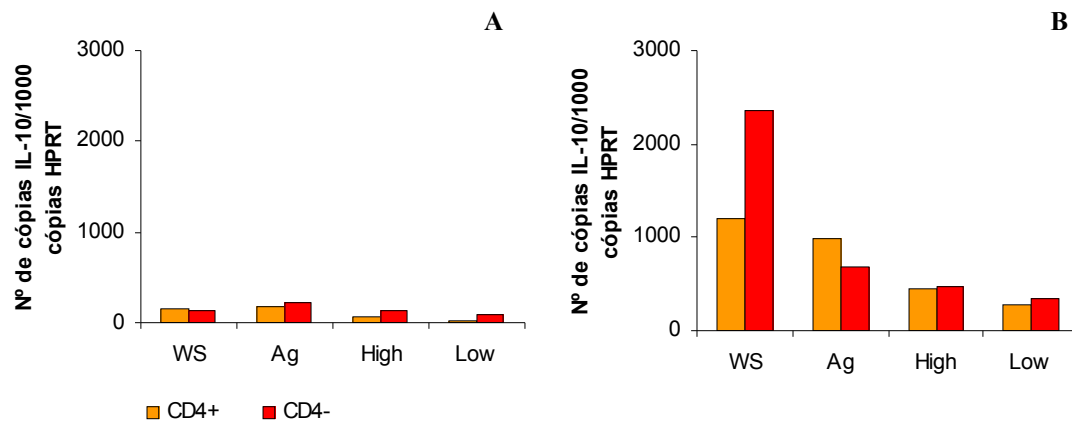
As fracções High e Low induziram um considerável aumento de mRNA de  $IFN\gamma$  nas células  $CD4^+$  e  $CD4^-$  dos animais infectados ( $P_{CD4^+}=0,031$ ;  $P_{CD4^-}=0,042$ ), em comparação com as células não estimuladas ou estimuladas com Ag (Fig. 48B).

**Figura 48** - Níveis de expressão de  $IFN\gamma$  nas células  $CD4^+$  e  $CD4^-$  do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção Low (A) e imunizados e infectados (B).



As células  $CD4^+$  e  $CD4^-$  dos animais imunizados apresentaram um reduzido número de cópias do mRNA de IL-10 (Fig. 49A). Contudo, nos animais imunizados e infectados as células não estimuladas apresentaram uma elevada expressão desta citocina. Quando estimuladas pelo Ag ou pelas fracções High e Low as células reduziram significativamente ( $P_{CD4^+}=0,045$ ;  $P_{CD4^-}=0,037$ ) a expressão de IL-10 (Fig. 49B).

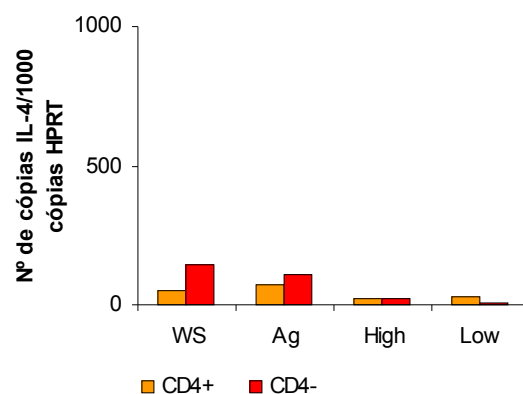
**Figura 49** - Níveis de expressão de IL-10 nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganinhos BALB/c imunizados com a fracção Low (A) e imunizados e infectados (B).



A expressão de IL-4 pelas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> dos murganinhos imunizados foi sempre reduzida (inferior a três cópias de IL-4/1000 cópias de HPRT).

Nos animais imunizados e infectados as células não estimuladas e estimuladas com Ag evidenciaram uma quantidade considerável de cópias de mRNA de IL-4. Porém, a estimulação adicional destas células com as fracções High e Low causou a diminuição significativa ( $P=0,049$ ) da expressão desta citocina (Fig.50).

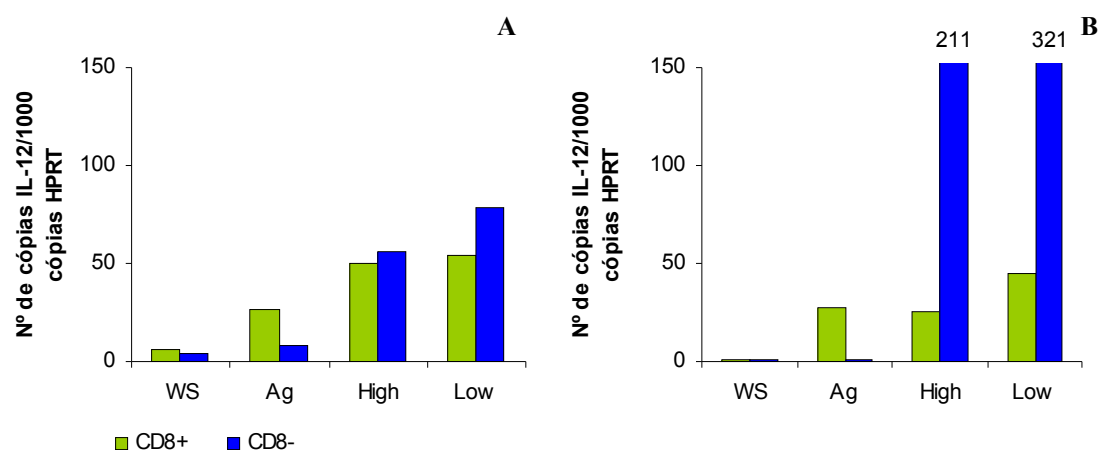
**Figura 50** - Níveis de expressão de IL-4 nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganinhos BALB/c imunizados com a fracção Low e infectados.



### 3.3.4 Células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> de BALB/c imunizados com a fracção proteica Low

A imunização com a fracção Low manteve as células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> com uma reduzida expressão de IL-12. Nos animais imunizados a estimulação adicional com as fracções High e Low induziu um ligeiro aumento de expressão (Fig. 51A). Nos animais imunizados e infectados observou-se um significativo aumento ( $P=0,016$ ) do número de cópias de IL-12 nas células CD8<sup>-</sup> quando estimuladas com as fracções High e Low em comparação com os animais imunizados (Fig. 51B).

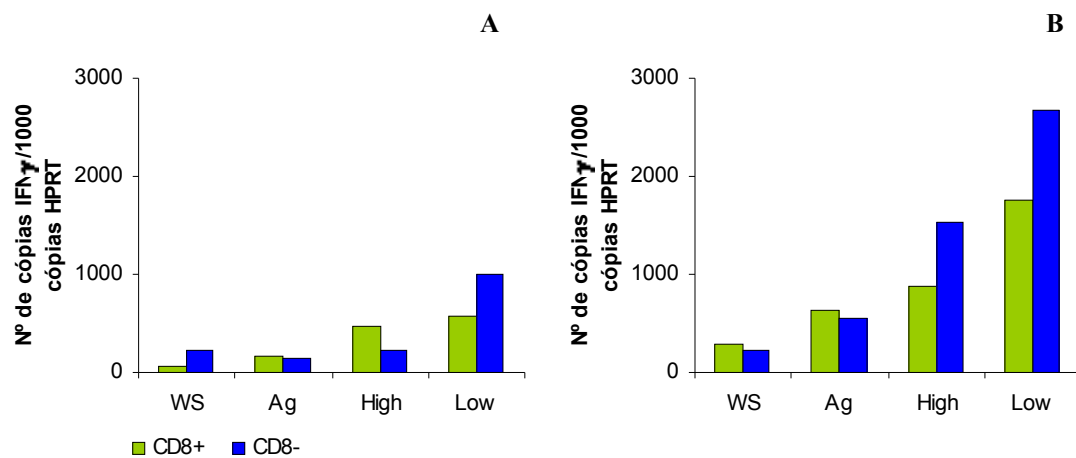
**Figura 51** - Níveis de expressão de IL-12 nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganços BALB/c imunizados com a fracção Low (A) e imunizados e infectados (B).



Nos murganços imunizados a estimulação das células CD8<sup>+</sup> com as fracções High e Low e das células CD8<sup>-</sup> com a fracção Low causou o aumento de cópias de mRNA de IFN $\gamma$  (Fig. 52A). Nos animais infectados, as células CD8<sup>-</sup> apresentaram aumentos consideráveis do número de cópias de mRNA desta citocina ( $P=0,030$ ) quando estimuladas por ambas as fracções (Fig. 52B).



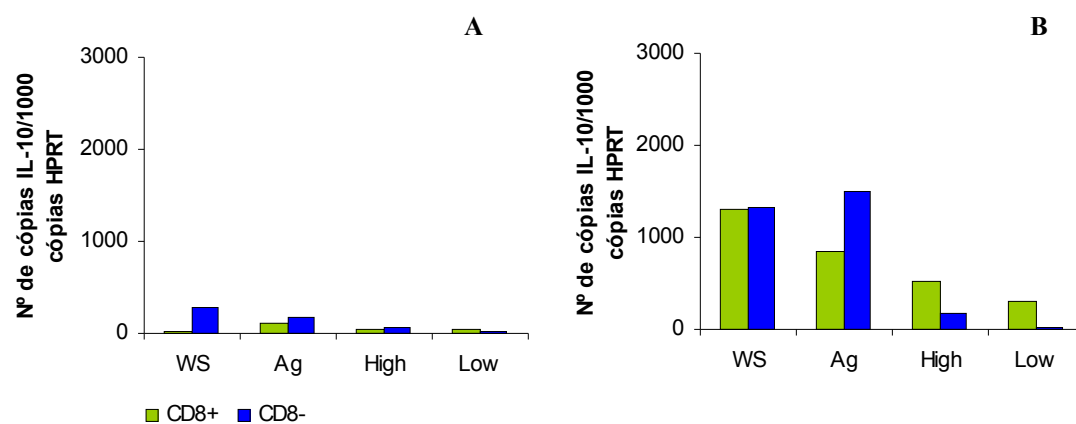
**Figura 52** - Níveis de expressão de IFN $\gamma$  nas células CD8 $^{+}$  e CD8 $^{-}$  do baço de murganinhos BALB/c imunizados com a fracção Low (A) e imunizados e infectados (B).



As células CD8 $^{+}$  e CD8 $^{-}$  dos murganinhos imunizados apresentaram níveis reduzidos de expressão de IL-10 (Fig. 53A). Contudo, nos animais imunizados e infectados as células não estimuladas evidenciaram níveis elevados de cópias do mRNA de IL-10.

Na presença de estimulação adicional pelas fracções High e Low mostraram uma significativa redução ( $P=0,041$ ) da expressão desta citocina (Fig. 53B). Quando estimuladas pelo Ag, apenas as células CD8 $^{+}$  mostraram redução da expressão de IL-10.

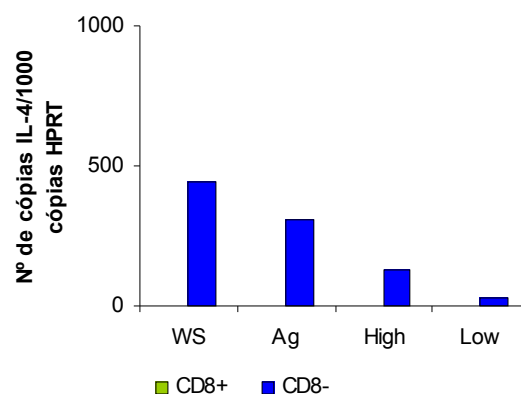
**Figura 53** - Níveis de expressão de IL-10 nas células CD8 $^{+}$  e CD8 $^{-}$  do baço de murganinhos BALB/c imunizados com a fracção Low (A) e imunizados e infectados (B).



A expressão de IL-4 pelas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> dos murganhos imunizados e CD8<sup>+</sup> dos animais imunizados e infectados foi sempre reduzida (inferior a 52 cópias de IL-4/1000 cópias de HPRT).

Nos animais imunizados e infectados as células CD8<sup>-</sup> mostraram níveis de expressão de IL-4 apreciáveis. Quando estimuladas exogenamente diminuíram o número de cópias do mRNA desta citocina. Esta diminuição foi mais acentuada nas células estimuladas pelas fracções High e Low (P=0,042) (Fig. 54).

**Figura 54** - Níveis de expressão de IL-4 nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção Low e infectados.



### 3.4 Produção de Citocinas

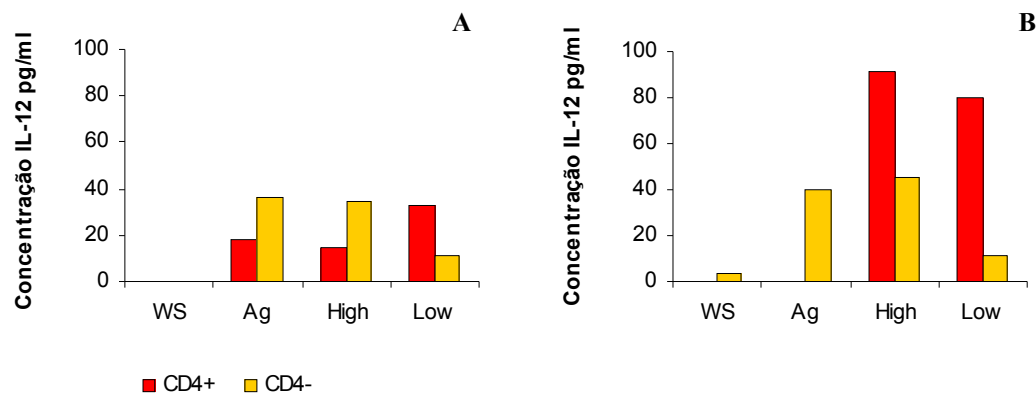
#### 3.4.1 Células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> de BALB/c imunizados com a fracção proteica High

As células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> dos animais imunizados com a fracção proteica High só revelaram produção de IL-12 quando adicionalmente estimuladas (Fig. 55A).

Nos animais imunizados e infectados, observou-se um aumento da produção de IL-12 nas células T CD4<sup>+</sup> (P=0,047) estimuladas com as fracções High e Low. Do mesmo

modo a produção de IL-12 foi consideravelmente maior nas células CD4<sup>-</sup> (P=0,049) quando estimuladas com o Ag e com a fracção High (Fig. 55B).

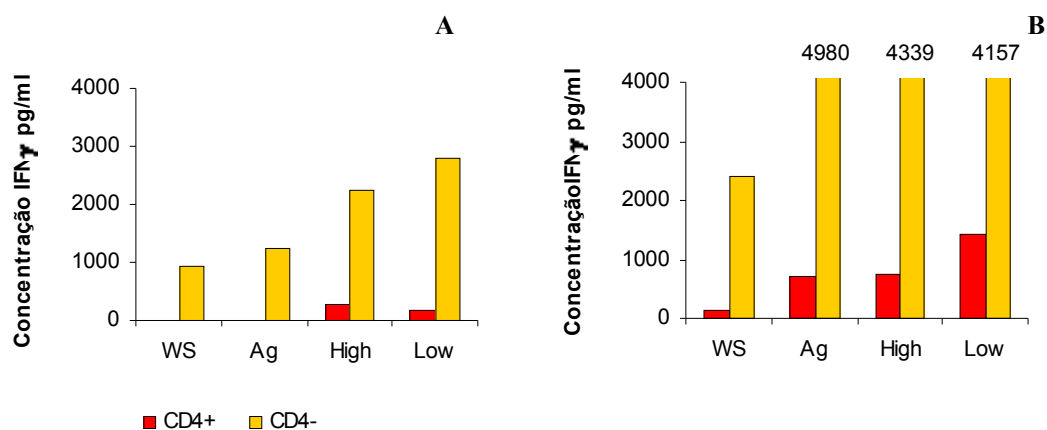
**Figura 55** – Produção de IL-12 nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção High (A) e imunizados e infectados (B).



As fracções High e Low induziram aumento da produção de IFN $\gamma$  nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> dos animais imunizados (Fig. 56A).

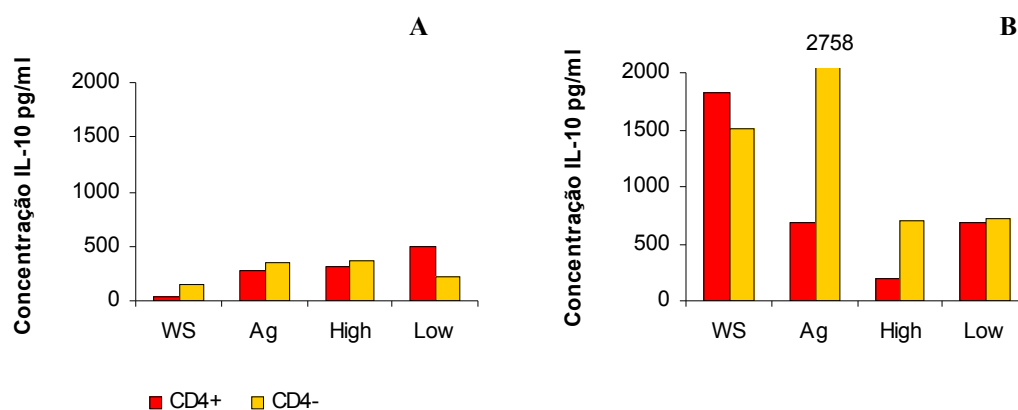
Porém, nos animais infectados a estimulação adicional com Ag e com as fracções High e Low causou um incremento significativo na produção desta citocina pelas células CD4<sup>+</sup> (P=0,021) e CD4<sup>-</sup> (P=0,047) (Fig. 56B).

**Figura 56** - Produção de IFN $\gamma$  nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção High (A) e imunizados e infectados (B).



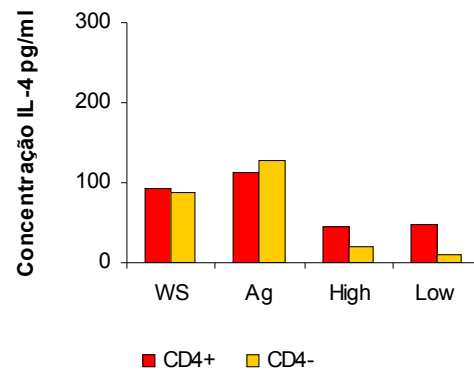
Nos murganhos imunizados, as células T CD4<sup>+</sup> estimuladas com Ag e com as fracções High e Low mostraram um aumento da produção de IL-10 quando comparadas com as células não estimuladas (Fig. 57A). No entanto, nos murganhos infectados a produção desta citocina foi significativamente menor nas células CD4<sup>+</sup> (P=0,038) e CD4<sup>-</sup> (P=0,036) estimuladas pelas fracções High e Low, quando comparadas com as células não estimuladas. A estimulação com o Ag causou elevada produção de IL-10 pelas células CD4<sup>-</sup> (Fig. 57B).

**Figura 57** - Produção de IL-10 nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção High (A) e imunizados e infectados (B).



A produção de IL-4 pelas células dos murganhos imunizados foi sempre reduzida (menor do que 15 pg/ml). Contudo, nos animais imunizados e infectados, as células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> não estimuladas e estimuladas com Ag produziram quantidades apreciáveis de IL-4. As células estimuladas com as fracções High e Low mostraram uma diminuição significativa (P=0,049) da quantidade de IL-4 produzida (Fig. 58).

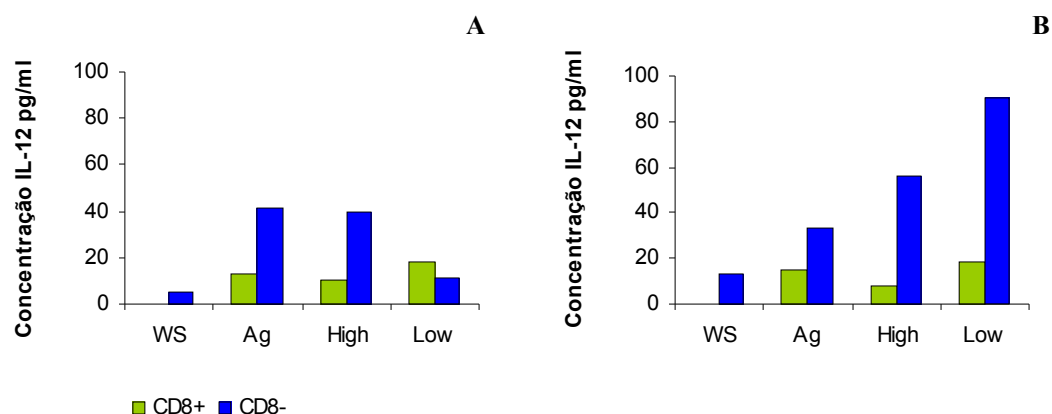
**Figura 58** - Produção de IL-4 nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção High e infectados.



### 3.4.2 Células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> de BALB/c imunizados com a fracção proteica High

A produção de IL-12 pelas células T CD8<sup>+</sup> estimuladas dos murganhos imunizados e imunizados e infectados foi reduzida. Nos animais imunizados, a estimulação adicional das células CD8<sup>-</sup> com o Ag e com a fracção Low causou a libertação de uma quantidade apreciável de IL-12 (Fig. 59A). Nos animais infectados, as células CD8<sup>-</sup> estimuladas pela fracção Low produziram quantidades elevadas ( $P=0,047$ ) desta citocina (Fig. 59B).

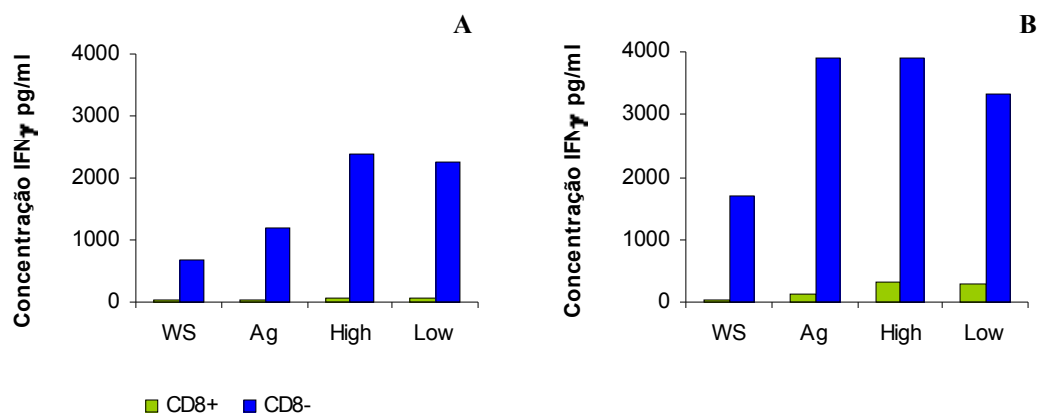
**Figura 59** - Produção de IL-12 nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção High (A) e imunizados e infectados (B).



Nos animais imunizados as células T CD8<sup>+</sup> produziram reduzidíssimas quantidades de IFN $\gamma$  quando estimuladas exogenamente ou não estimuladas. Porém, as células CD8<sup>-</sup> libertaram quantidades apreciáveis ( $P=0,046$ ), sobretudo quando estimuladas pelas fracções proteicas (Fig. 60A).

Do mesmo modo as células T CD8<sup>+</sup> dos murganhos imunizados e infectados, estimuladas pelos diferentes antigénios apresentaram baixa produção de IFN $\gamma$ , enquanto que as fracções High e Low e o Ag induziram um considerável aumento ( $P=0,036$ ) da produção de IFN $\gamma$  nas células CD8<sup>-</sup> (Fig. 60B).

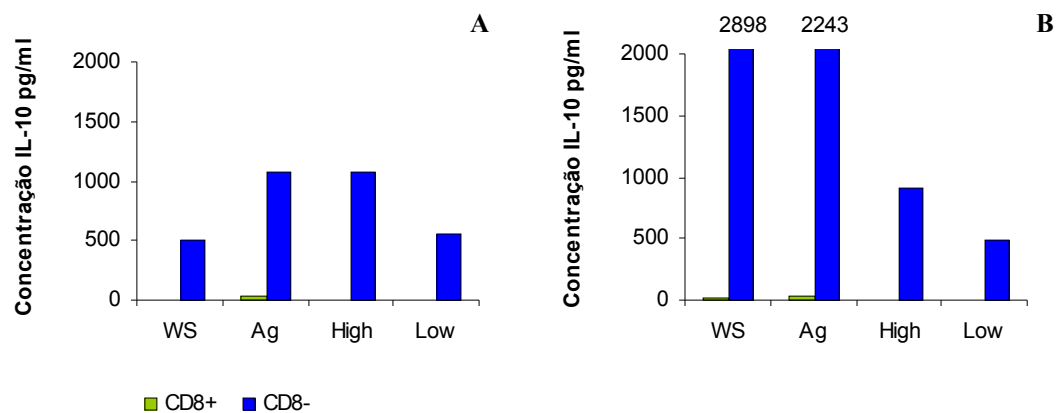
**Figura 60** - Produção de IFN $\gamma$  nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção High (A) e imunizados e infectados (B).



A produção de IL-10 pelas células T CD8<sup>+</sup> foi sempre reduzida ou indetectável, quer nos animais imunizados (Fig. 61A), quer nos imunizados e infectados (Fig. 61B).

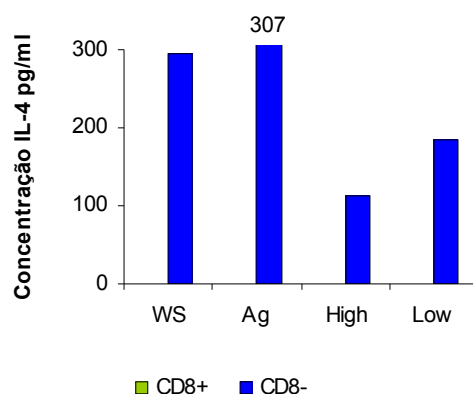
Porém, nos animais imunizados e infectados, as células CD8<sup>-</sup> não estimuladas ou estimuladas pelo Ag libertaram elevadas quantidades de IL-10. A estimulação com as fracções proteicas High e Low, causaram uma significativa diminuição ( $P=0,032$ ) desta produção.

**Figura 61** - Produção de IL-10 nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção High (A) e imunizados e infectados (B).



Não se detectou produção de IL-4 pelas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> dos murganhos imunizados e pelas células CD8<sup>+</sup> dos animais imunizados e infectados. Nos animais infectados as células CD8<sup>-</sup> não estimuladas ou estimuladas com o Ag libertaram quantidades elevadas de IL-4. A estimulação com as fracções High e Low diminuiu significativamente ( $P=0,044$ ) a quantidade de IL-4 produzida por estas células (Fig. 62).

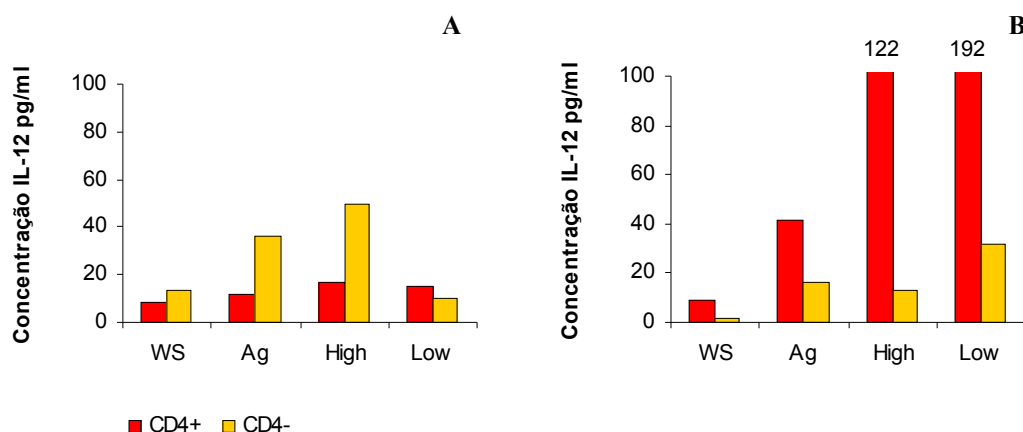
**Figura 62** - Produção de IL-4 nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção High e infectados.



### 3.4.3 Células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> de BALB/c imunizados com a fracção proteica Low

Nos murganhos imunizados com a fracção Low a estimulação das células CD4<sup>+</sup> com a fracção High ou com o Ag causou um ligeiro aumento na produção de IL-12 (Fig. 63A). Nos murganhos imunizados e infectados a estimulação das células T CD4<sup>+</sup> com as fracções High e Low induziu um aumento significativo ( $P=0,042$ ) da produção de IL-12. As células CD4<sup>-</sup> estimuladas apresentaram apenas ligeiros aumentos da quantidade libertada desta citocina (Fig. 63B) quando comparadas com as mesmas células não estimuladas.

**Figura 63** - Produção de IL-12 nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção Low (A) e imunizados e infectados (B).

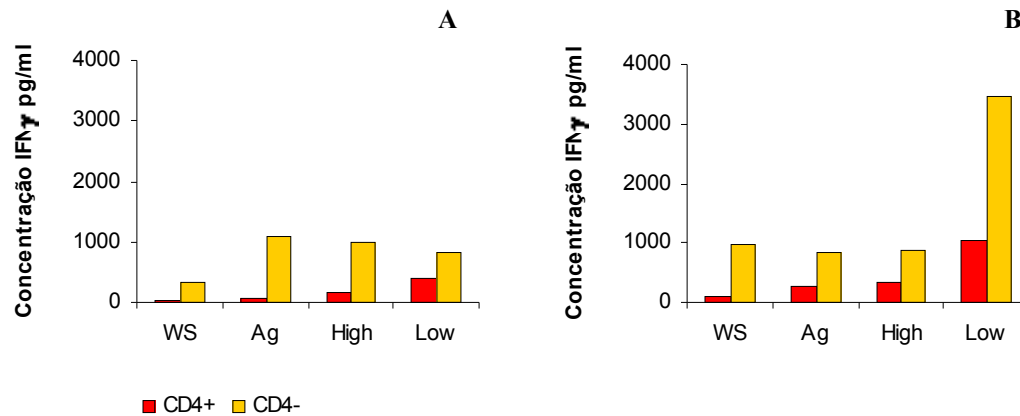


As células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> dos animais imunizados aumentaram os níveis de produção de IFN $\gamma$  na presença de estimulação exógena (Fig. 64A).

Nos animais imunizados e infectados a fracção Low induziu aumento de IFN $\gamma$  nas células CD4<sup>+</sup> e nas células CD4<sup>-</sup>, tendo atingido nestas últimas valores estatisticamente significativos ( $P=0.021$ ) (Fig. 64B).



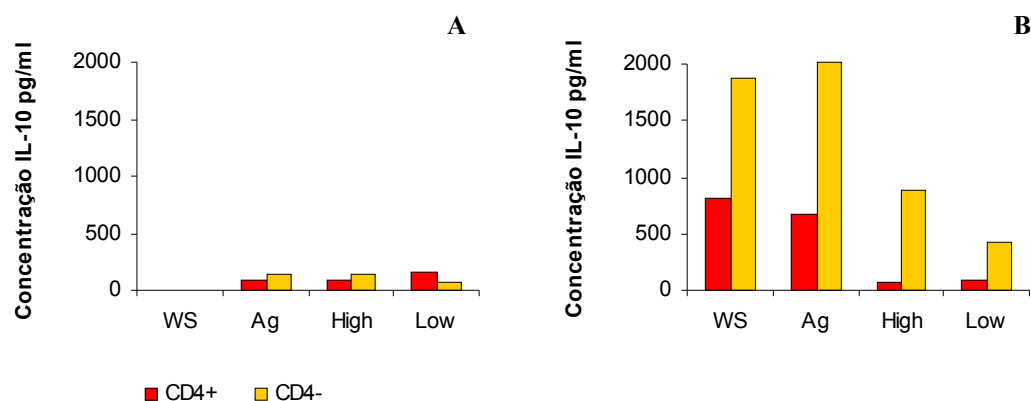
**Figura 64** - Produção de IFN $\gamma$  nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção Low (A) e imunizados e infectados (B).



Nos animais imunizados a quantidade de IL-10 detectada nos sobrenadantes das células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> foi reduzida (Fig. 65A).

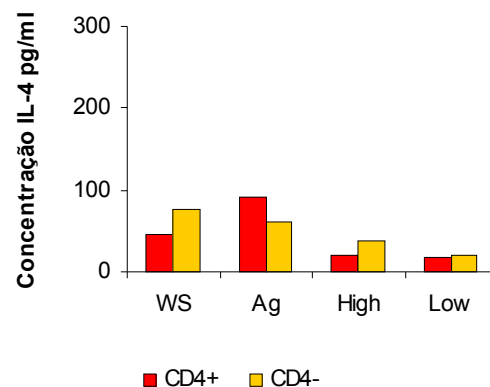
No entanto, nos murganhos imunizados e infectados a produção desta citocina pelas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> não estimuladas e estimuladas com Ag foi considerável. A adição das fracções High e Low às células causou uma diminuição significativa ( $P=0,040$ ) na produção desta citocina, quando comparada com as células não estimuladas ou estimuladas com Ag (Fig. 65B).

**Figura 65** - Produção de IL-10 nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção Low (A) e imunizados e infectados (B).



Nos murganhos imunizados não foi possível detectar a produção de IL-4 pelas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup>. Nos animais imunizados e infectados verificou-se uma significativa diminuição ( $P=0,049$ ) da quantidade de IL-4 produzida nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> estimuladas com as fracções High e Low, quando comparada com as células não estimuladas e estimuladas com Ag (Fig 66).

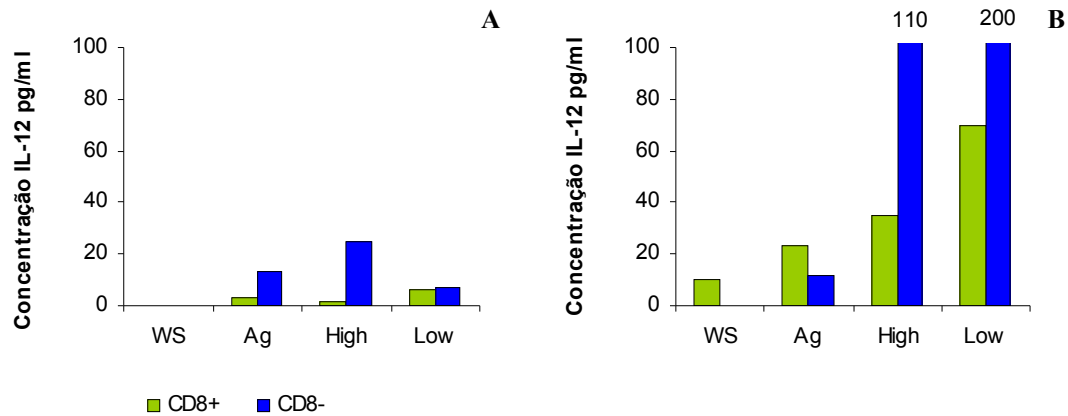
**Figura 66** - Produção de IL-4 nas células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção Low e infectados.



#### 3.4.4 Células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> de BALB/c imunizados com a fracção proteica Low

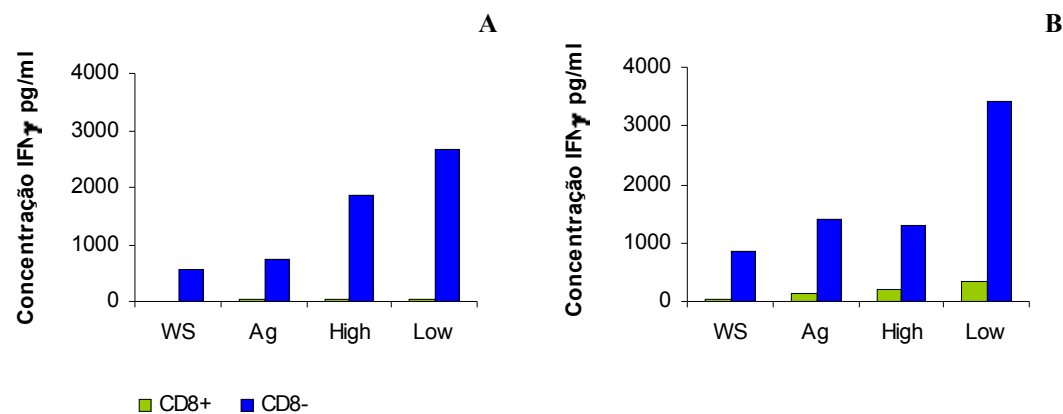
As células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> estimuladas dos BALB/c imunizados libertaram pequenas quantidades de IL-12 (Fig. 67A). Nos animais infectados e imunizados com a fracção Low, as células T CD8<sup>+</sup> estimuladas com o grupo Low ( $P=0,049$ ) e as células CD8<sup>-</sup> estimuladas com as fracções High e Low ( $P=0,047$ ) apresentaram um aumento da produção desta citocina (Fig.67B).

**Figura 67** - Produção de IL-12 nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção Low (A) e imunizados e infectados (B).



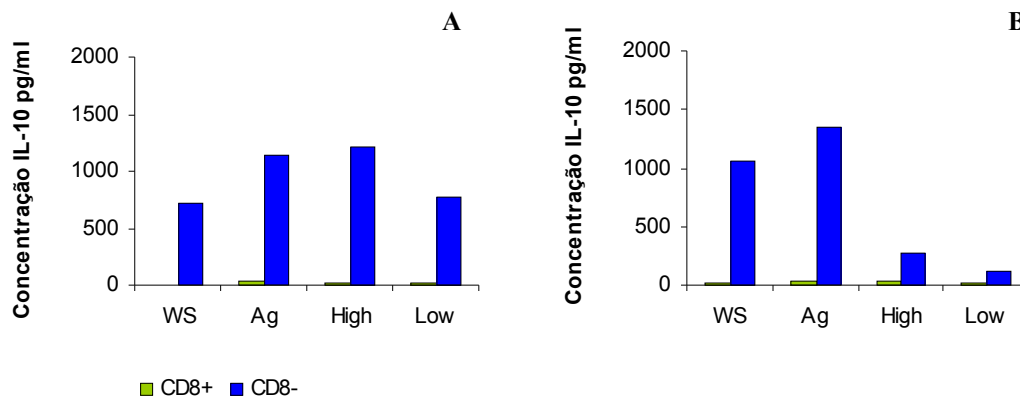
As células T CD8<sup>+</sup> dos animais imunizados apresentaram sempre níveis reduzidos de IFN $\gamma$ . Pelo contrário, as células CD8<sup>-</sup> estimuladas com as fracções High e Low aumentaram a quantidade desta citocina (Fig. 68A). As células T CD8<sup>+</sup> dos murganhos imunizados e infectados estimuladas com as fracções proteicas evidenciaram pequenos aumentos de IFN $\gamma$ . Contudo, as células CD8<sup>-</sup> estimuladas pela fracção Low libertaram elevadas quantidades ( $P=0,042$ ) desta citocina (Fig.68B).

**Figura 68** - Produção de IFN $\gamma$  nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção Low (A) e imunizados e infectados (B).



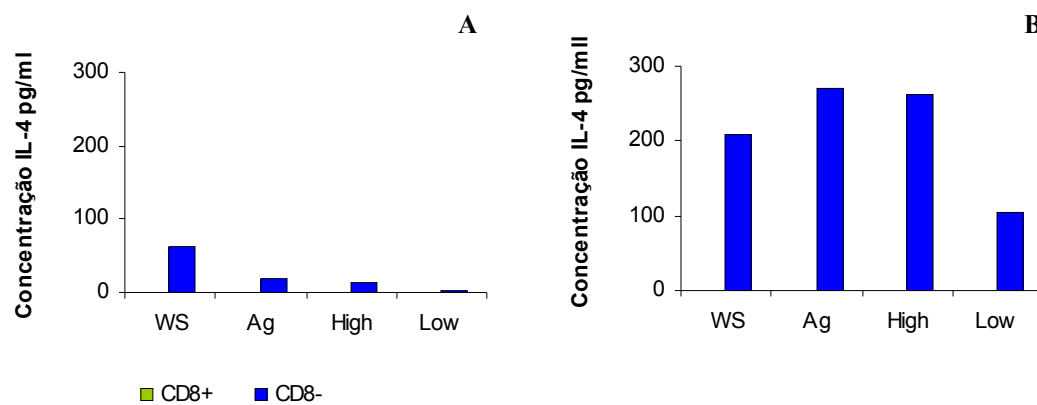
A produção de IL-10 pelas células T CD8<sup>+</sup> na presença ou ausência de estimulação foi sempre reduzida ou indetectável, quer nos animais imunizados, quer nos imunizados e infectados. As células CD8<sup>-</sup> dos animais imunizados (Fig. 69A) produziram quantidades apreciáveis de IL-10, tal como as células CD8<sup>-</sup> não estimuladas ou estimuladas com Ag dos animais imunizados e infectados. Porém, nestes murganhos a produção de IL-10 sofreu uma significativa redução ( $P=0,030$ ) nas células estimuladas pelas fracções proteicas High e Low (Fig. 69B).

**Figura 69** - Produção de IL-10 nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção Low (A) e imunizados e infectados (B).



Não foi detectada a produção de IL-4 pelas células T CD8<sup>+</sup> dos murganhos imunizados (Fig. 70A) e imunizados e infectados. As células CD8<sup>-</sup> dos animais imunizados produziram, apenas, pequenas quantidades desta citocina, enquanto que, nos animais imunizados e infectados as células CD8<sup>-</sup> não estimuladas ou estimuladas com Ag e fracção High libertaram quantidades apreciáveis de IL-4. A estimulação com a fracção Low causou uma redução significativa ( $P=0,044$ ) na produção desta citocina (Fig. 70B), quando comparada com as células não estimuladas e estimuladas com Ag.

**Figura 70** – Produção de IL-4 nas células CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup> do baço de murganhos BALB/c imunizados com a fracção Low (A) e imunizados e infectados (B).



## **CAPÍTULO IV. DISCUSSÃO**

## CAPÍTULO IV

A apresentação clínica das leishmanioses e a sua evolução resulta de um complexo conjunto de interacções que se estabelecem entre o parasita e o sistema imunitário do hospedeiro. A evolução da infecção depende essencialmente da capacidade do macrófago em destruir o parasita. Esta actividade é determinada pelo estabelecimento de uma resposta imunitária celular eficaz que, por sua vez, se encontra dependente do equilíbrio que se estabelece entre as diferentes citocinas produzidas pelo hospedeiro. Embora exista informação abundante sobre a resposta imunológica na infecção por *Leishmania* em modelo murino, são relativamente poucos os estudos que abordam a resposta imunológica desencadeada por espécies de *Leishmania* viscerotrópicas, e os existentes utilizam na sua maioria a espécie *L. donovani*, causadora de leishmaniose visceral antroponótica. Consequentemente, a leishmaniose visceral zoonótica (LVZ), com características patogénicas e epidemiológicas específicas, é a que suscita mais questões.

*Leishmania* dispõe de um número crescente de moléculas antigénicas que desempenham funções importantes no desenvolvimento do parasita ao longo do ciclo de vida, como por exemplo a gp63. As macromoléculas antigénicas libertadas pelos microrganismos têm também um papel importante no estabelecimento das interacções imunológicas e fisiológicas com o hospedeiro. Os produtos libertados por *Leishmania* sp. têm sido descritos em diferentes fases do ciclo de vida, quer no vector (Schlein *et al*, 1991, Blum & Oppendoes, 1994), quer no hospedeiro vertebrado (El-On *et al*, 1980, Londner *et al*, 1983, Mukerji *et al*, 1986). Existem proteínas produzidas pelo promastigota que permitem a evasão à lise mediada pelo complemento e que influenciam, não só, o

processo de reconhecimento por parte dos macrófagos, como a sua fagocitose (Russel & Wilhelm, 1986, Brittingham *et al*, 1995). Contudo, apesar do diversificado conteúdo antigénico identificado neste parasita, alguns autores concluíram que o período inicial da infecção por *Leishmania* é silencioso, não desafiando a imunidade celular do hospedeiro (Belkaid *et al*, 2000, Santos-Gomes *et al*, 2002).

As proteínas excretadas são obviamente em menor número que as que fazem parte da constituição dos microrganismos. Por outro lado estas proteínas são, na sua maioria, reconhecidas pelos anticorpos do hospedeiro (Cibrelus *et al*, 1999). Neste estudo as proteínas libertadas por promastigotas de *L. infantum* foram incluídas em três grupos, High, Inter e Low, consoante o seu peso molecular e foram reconhecidas pelo soro de cães experimentalmente infectados com *L. infantum*.

A fracção Low foi muito menos libertada que a fracção Inter, pelo que teve de se recorrer a uma técnica mais sensível para a poder visualizar. Contrariamente a fracção Inter, correspondendo maioritariamente à gp63, é libertada em grande quantidade. De facto, a forma activa da metaloprotease gp63 é libertada por várias espécies de *Leishmania*. Esta glicoproteína digere a matriz extra celular, facilitando a migração dos parasitas (McGwire *et al*, 2002, 2003) através da matriz e da membrana basal (Ghosh *et al*, 1999, Bandyopadhyay *et al*, 2002), contribuindo para a disseminação do parasita para locais distantes do sítio da infecção

Este estudo teve como objectivo principal investigar a capacidade das proteínas libertadas por promastigotas de *L. infantum* de modelar a resposta imunológica, em dois hospedeiros com diferentes características genéticas que se traduziram fenotipicamente em diferentes graus de resistência/susceptibilidade à infecção por *Leishmania*.

De facto confirmou-se neste estudo, que a estirpe de murganhos BALB/c é também mais sensível à infecção por *L. infantum*, demonstrando densidade parasitária crescente. Os murganhos C57BL/6 evidenciaram restrição na multiplicação parasitária no decurso da infecção associado a níveis elevados de proliferação linfocitária específica. Por outro lado, os murganhos BALB/c apresentaram níveis de proliferação inferiores aos apresentados pelos animais saudáveis, sugerindo imunossupressão. Estes resultados confirmaram a diferente capacidade que estas duas estirpes de murganhos possuem para



lidar com a infecção por *Leishmania* (Heizel *et al*, 1989, Lehmann *et al*, 2000). Quando comparados com os murganhos C57BL/6 que conseguiram controlar o número de parasitas no baço e desenvolveram uma resposta linfoproliferativa específica, os murganhos BALB/c evidenciaram uma maior susceptibilidade a *L. infantum* associada a uma incapacidade dos leucócitos esplênicos proliferarem especificamente.

Estas duas estirpes de murganhos representam em vários aspectos as situações extremas que se observam na infecção natural da população canina e humana, podendo ser considerados:

- *modelo de infecção assintomática* (C57BL/6) em que os animais se encontram infectados com densidade parasitária reduzida e apresentam resposta linfoproliferativa específica; este modelo de infecção reproduz os hospedeiros naturalmente infectados assintomáticos (portadores sãos), e por isso aparentemente mais resistentes, que existem nas áreas endémicas de LVZ (Carvalho *et al*, 1992, Cabral *et al*, 1998);
- *modelo de infecção sintomática* (BALB/c), em que a carga parasitária é crescente e apresentam imunossupressão celular; este modelo de infecção reproduz os casos de leishmaniose visceral e de leishmaniose canina que ocorrem na natureza.

Uma das características da LV é a imunossupressão dos linfócitos totais, descrita para diversos hospedeiros (Mukherjee *et al*, 2003; Santos-Gomes *et al*, 2002, Leandro *et al*, 2001, Cabral *et al* 1998, Carvalho *et al*, 1985)

Neste estudo a incapacidade dos linfócitos proliferarem, quando adicionalmente estimulados pelos diferentes antigénios, não parece estar relacionado com a produção de IL-12. Na estirpe C57BL/6 a proliferação específica está associada à ausência de IL-12, enquanto que na estirpe BALB/c os níveis de proliferação permaneceram constantes, independentemente de ocorrer produção ou não desta citocina. De facto, Akuffo e colaboradores (1999) observaram que a adição de IL-12 recombinante às células mononucleares do sangue periférico de dadores de sangue tinha efeitos contraditórios, dependendo da concentração da citocina utilizada.

Na estirpe de murganhos que controlou a multiplicação parasitária no baço (C57BL/6) e não apresentou imunossupressão da proliferação linfocitária, as fracções proteicas induziram maior aumento dos níveis de proliferação que o Ag, que é normalmente utilizado como estimulação exógena em estudos imunológicos. Esta observação sugere que as proteínas libertadas pelos promastigotas virulentos de *L. infantum* possuem maior

capacidade de estimulação celular que o antígeno parasitário solúvel preparado a partir de promastigotas avirulentos.

A estimulação exógena com os quatro antígenos (Ag e frações proteicas High, Inter e Low) também induziu diferentes padrões de expressão e produção de citocinas nas duas estirpes de murganhos. No início da infecção, com maior número de parasitas no baço, os leucócitos esplênicos dos murganhos C57BL/6 expressaram níveis elevados de citocinas. No entanto, a sua produção não aumentou devido à estimulação antigénica, até ocorreu inibição da produção de IL-12, IL-4 e IL-10. Estas observações indicam que, neste caso particular, as frações proteicas e o Ag exerceram efeitos semelhantes na indução da produção de citocinas pelos leucócitos esplênicos.

Com a estabilização da densidade parasitária (no dia 45 p.i.), os leucócitos estimulados revelaram uma diminuição generalizada dos níveis de mRNA de citocinas. Esta diminuição da expressão foi acompanhada pela redução da produção de IL-12 e de IFN $\gamma$ . Contudo, as células estimuladas com a fração Low libertaram uma pequena quantidade de IL-4, enquanto que a citocina anti-inflamatória IL-10 foi especificamente produzida, apontando para o predomínio de uma resposta do tipo Th2. Estes resultados apontam para uma associação entre a produção da IL-10 e a manutenção de uma infecção crónica no baço destes animais, provavelmente através da atenuação da actividade leishmanicida dos macrófagos (Belkaid *et al*, 2001, Kane & Mosser, 2001). Para além disso a IL-10 não parece conduzir ao aumento da multiplicação parasitária, tal como foi verificado em outras estirpes de murganhos (Gomes-Pereira *et al*, 2004a). Também no modelo canino não existe correlação entre a expressão de mRNA de IL-10 e a severidade da infecção (Santos-Gomes *et al*, 2002).

Durante o período de evolução da infecção analisado, os diferentes estímulos antigénicos não conseguiram induzir os leucócitos dos murganhos BALB/c a expressarem citocinas. Apenas, quando a densidade parasitária aumentou, as células estimuladas com o Ag mostraram um maior número de cópias de mRNA de IFN $\gamma$ , IL-10 e IL-4, sugerindo que as frações proteicas tenham sido pouco reconhecidas pelas células esplênicas. Contudo, apesar, dos baixos níveis de expressão de citocinas observado nos leucócitos no início da infecção, as células estimuladas pelo Ag foram capazes de libertar inicialmente quantidades apreciáveis de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-12 ao qual se juntou a libertação de IL-10 no final do período de observação. Estes resultados

apontam para a indução de uma resposta mista Th1/Th2 pelo antígeno parasitário. A existência de respostas mistas Th1/Th2 já tinha sido descrita para *L. donovani* em murganhos (Kaye *et al*, 1991, Mazumdar *et al*, 2004). Com o aumento da densidade parasitária, os leucócitos esplénicos estimulados pelas três fracções proteicas exibiram diferentes efeitos na actividade destas células. Enquanto que, a fracção Inter foi capaz de promover a libertação de IL-4, a fracção Low induziu a produção de IL-12 e a fracção High promoveu a libertação de IL-4 e IL-12. Estes resultados sugerem que as proteínas libertadas por *L. infantum* desempenham acções antagonistas na imunomodulação das células mononucleares do hospedeiro. Através da libertação de IL-12, as fracções High e Low poderão estar a controlar a replicação do parasita, possivelmente induzindo a actividade citotóxica das células NK (Bacellar *et al*, 1996) adiando a morte do hospedeiro e aumentando o tempo necessário para que ocorra mais do que um ciclo de transmissão dos parasitas. Porém, as quantidades apreciáveis de IL-4 induzidas pelas fracções High e Inter poderão antagonizar a acção da IL-12, prevenindo a actividade macrofágica (Oswald *et al*, 1992) e evitando a completa eliminação dos parasitas.

Os resultados obtidos indicam que as proteínas libertadas por *L. infantum* exercem diferentes efeitos nos leucócitos esplénicos consoante as características genéticas do hospedeiro e a magnitude da densidade parasitária. De facto, as proteínas High, Inter e Low parecem exercer efeitos opostos na expressão de citocinas pelos leucócitos das duas estirpes de murganhos com densidades parasitárias idênticas. A excepção apenas se verifica relativamente à expressão de IL-4 que é idêntica nos dois tipos de animais independentemente do tipo de antígeno usado na estimulação celular.

Outros trabalhos também revelaram que diferentes proteínas de *Leishmania* provocam respostas imunológicas distintas (Russo *et al*, 1993, Skeiky *et al*, 1995). A capacidade que uma mesma proteína, libertada pelos promastigotas, possui para induzir diferentes respostas imunológicas mediadas por células, em diferentes hospedeiros sugere que estas proteínas poderão desempenhar um papel relevante na capacidade de adaptação destes parasitas a vários hospedeiros vertebrados (raposa, cão, homem) e invertebrados (*Lutzomyia* e *Phlebotomus*) e em última análise na própria sobrevivência de *L. infantum*. Os resultados obtidos neste estudo põem também em evidência que o desenvolvimento de estratégias profiláticas para o controlo da LVZ, como, por exemplo, uma vacina, terão que necessariamente ter em conta as características genéticas do hospedeiro e a

existência de imunidade concomitante, conferida pela presença de um número limitado de parasitas.

O desenvolvimento da LV está dependente da estimulação das diferentes subpopulações de células T e das citocinas que conseqüentemente são produzidas. No decurso deste trabalho confirmou-se que os produtos libertados por *L. infantum* podem ser reconhecidos pelos leucócitos funcionando como antígenios, intervindo no processo de activação e diferenciação celular. Face a estes resultados tornou-se imperioso analisar o efeito das fracções proteicas libertadas por *L. infantum* na activação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em duas estirpes de murganhos com diferentes características genéticas.

As subpopulações celulares CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, da estirpe de murganhos C57BL/6, analisadas no decurso deste estudo e todas as fracções celulares (CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup>) estudadas da estirpe de murganhos BALB/c, contribuíram fortemente para a imunossupressão, dado que nem com diferentes tipos de antígenios de *L. infantum* apresentaram níveis significativos de proliferação. Estas observações sugerem a existência de uma imunossupressão específica alargada a diferentes conjuntos proteicos do parasita. No entanto, a fracção High induziu níveis de proliferação significativos nas células CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> dos murganhos C57BL/6 com 45 dias de infecção e a fracção Inter nas células CD8<sup>+</sup>. Estes resultados demonstram que as fracções High e Inter, foram reconhecidas e que conseguiram reverter a imunossupressão observada no início da infecção. Contudo, as células CD4<sup>+</sup> parecem estar directamente implicadas na regulação da linfoproliferação.

Apesar de serem incapazes de proliferar quando estimuladas pelos diferentes antígenios, as células T CD4<sup>+</sup> de murganhos BALB/c apresentaram expressão elevada de IL-12 e IL-4 na fase inicial da infecção. Porém, no decurso da infecção houve um decréscimo acentuado dos níveis de expressão destas citocinas. Estes resultados permitem estabelecer uma associação entre a regulação dos níveis de mRNA de IL-12 e IL-4 e o aumento da densidade parasitária no baço. Apesar da diminuição da expressão das citocinas as células estimuladas pela fracção Low mantiveram níveis elevados de mRNA de IL-12 sugerindo que esta fracção proteica é capaz de induzir as células CD4<sup>+</sup> a resistir à regulação negativa da transcrição dos genes daquelas citocinas aparentemente determinada pela intensificação parasitária. Situação idêntica parece ter ocorrido com o IFN $\gamma$  acompanhada por alguma produção. No início da infecção, as três fracções

proteínas conseguiram induzir níveis consideráveis de IFN $\gamma$ . Contudo, com a progressão da doença apenas a fracção Low conseguiu manter a expressão desta citocina em quantidades apreciáveis.

A expressão elevada da IL-12 (p40) apresentadas pelas células T CD4<sup>+</sup> estimuladas com as fracções High e Inter na fase inicial da infecção e nas células da fase posterior da infecção estimuladas com a fracção Low traduziu-se na libertação de quantidades apreciáveis da citocina bioactiva (IL-12p70). Estas observações indicam que a fracção Low tem propriedades antigénicas adequadas à activação de uma resposta protectora nas células CD4<sup>+</sup> dos murganhos BALB/c com infecção progressiva, por intermédio da indução de produção de IL-12.

Nos murganhos C57BL/6, a incapacidade das células CD4<sup>+</sup> proliferarem esteve associada à fraca indução da expressão de citocinas. Uma das excepções foi os níveis de expressão de IL-10 observados nas células estimuladas pela fracção Low, quando a carga parasitária do baço foi mais elevada. A outra excepção foi o número de cópias de mRNA de IL-4, nas células estimuladas pela fracção Inter, quando se observou a diminuição da carga parasitária, que se traduziu numa elevada produção desta citocina. Apesar dos níveis reduzidos de mRNA de citocinas, as células CD4<sup>+</sup> libertaram em ambos os dias de colheita quantidades apreciáveis de IFN $\gamma$ , em particular quando estimuladas pela fracção High. Níveis consideráveis de IL-12 foram também detectados nestas células estimuladas pela fracção Low, um mês após o início da infecção. Estes resultados sugerem uma dissociação entre a indução da expressão de citocinas e a libertação da respectiva proteína bioactiva (Raquib *et al*, 1996, Nylén *et al*, 2004).

No início da infecção, as fracções High e Low induziram as células CD4<sup>+</sup> dos murganhos C57BL/6 a evidenciarem uma resposta predominantemente do tipo Th1 acompanhado pela libertação de IL-12, que pode ter contribuído para a restrição da multiplicação parasitária. Estes resultados apontam para uma modulação sinérgica das células CD4<sup>+</sup> por parte das duas fracções proteicas no sentido de uma resposta protectora com produção de IL-12, que tem um papel muito importante na estimulação de APCs (Will *et al*, 1992, Croft & Dubey, 1997, Konecny *et al*, 1999), na indução de uma resposta do tipo Th1, bem como na inibição da produção de IL-4 (Heinzel *et al*, 1993, Sypek *et al*, 1993). Para além disso, o IFN $\gamma$  produzido pode reforçar o aumento da expressão e produção de IL-12 (Ma *et al*, 1996).

Com o decorrer da infecção a fracção Inter induziu as células CD4<sup>+</sup> dos murganhos BALB/c a apresentarem uma resposta mista Th1/Th2 (com libertação de IFN $\gamma$ , IL-12 e IL-10). Embora não tivesse ocorrido aumento da carga parasitária, as células CD4<sup>+</sup> dos murganhos C57BL/6 estimuladas pela fracção High também apresentaram uma resposta mista Th1/Th2, com produção de IFN $\gamma$  e IL-10, enquanto que, a fracção Inter induziu as células a apresentarem uma resposta Th2 com produção de IL-4 e IL-10. Os resultados obtidos demonstram que uma vez estabelecida a infecção a fracção Inter promove a libertação de IL-10 pelas células CD4<sup>+</sup> de estirpes de murganhos geneticamente diferentes, independentemente das células terem conseguido desenvolver imunidade protectora nas fases iniciais da infecção.

Apesar de também não evidenciarem capacidade de proliferarem as células CD8<sup>+</sup> dos murganhos BALB/c apresentaram, no início da infecção, elevada expressão de IL-10 e IL-4 quando estimuladas pelas três fracções proteicas. De igual modo, as fracções Inter e Low induziram estas células a expressarem quantidades apreciáveis de IFN $\gamma$ , em ambos os dias de colheita enquanto que a fracção Low estimulou a expressão de IL-12 no final do período de observação. Contudo, as quantidades de IFN $\gamma$ , IL-12, IL-10 e IL-4 libertadas não se mostraram equivalentes ao aumento de expressão verificado. Estas observações demonstram que, apesar de haver reconhecimento das fracções proteicas ocorreu um rápido consumo das citocinas produzidas ou regulação pós-transcricional. A discrepância entre os níveis de mRNA das citocinas e a respectiva produção foram também descritas em estudos com outras infecções (Raquib *et al*, 1996, Nylén *et al*, 2004). No seu conjunto estes resultados sugerem que as citocinas foram rapidamente consumidas/utilizadas ou o mRNA não sofreu tradução, possivelmente devido a mecanismos de regulação pós-transcricionais. Nos últimos anos estes mecanismos que controlam a expressão dos genes, tornaram-se mais conhecidos, e parecem desempenhar um papel importante, particularmente na estabilidade da regulação da transcrição dos genes que codificam citocinas (Butler *et al*, 2002, Atasoy *et al*, 2003).

É também importante salientar que no presente trabalho a IL-12 foi analisada através da detecção do mRNA da IL-12 (p40) que é um dos dímeros da proteína bioactiva, a IL-12 (p70), cuja produção foi quantificada por ELISA. As duas proteínas que constituem a IL-12 (p70), p40 e p35, são codificadas por genes diferentes e expressas de forma independente. A proteína bioactiva só é produzida por células que expressam os dois

genes. O gene da p35 é expresso constitutivamente ou após estimulação apropriada por um conjunto diversificado de células enquanto que a expressão do gene da p40 é mais restrita. As células tipicamente produtoras de IL-12, como as APCs, expressam mais p40 do que p35. A p40 produzida em excesso dá origem a homodímeros que inibem a síntese de IL-12 ou ligam-se aos receptores da IL-12 antagonizando a actividade da IL-12 (Storkus *et al*, 1998; Abdi 2002, Trinchieri, 2003, Oliveira et al, 2005). Serão, assim, necessários mais estudos sobre o papel das fracções proteicas na expressão da subunidade p35, para esclarecer os mecanismos que podem estar envolvidos na produção de IL-12 bioactiva no decurso da infecção por *Leishmania*.

A presença da fracção Low induziu as células CD8<sup>+</sup> de murganhos C57BL/6 a expressarem níveis superiores de mRNA de IL-12 acompanhado pela produção da citocina bioactiva nos dois dias de colheita. As três fracções proteicas foram também responsáveis pelo aumento do número de cópias de mRNA e consequente produção de IFN $\gamma$ , quando a carga parasitária foi inferior. As fracções High e Low causaram aumento da expressão de IL-10, que no entanto, não se reflectiu na quantidade de citocina libertada.

No seu conjunto os resultados indicam que as células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> dos murganhos C57BL/6 com um mês de infecção, conseguiram montar uma resposta do tipo Th1/Tc1, libertando quantidades consideráveis de IFN $\gamma$ , quando exogenamente estimuladas pelas fracções proteicas de *L. infantum*. Simultaneamente, a fracção Low modulou sinergicamente as duas subpopulações celulares de modo a produzirem quantidades apreciáveis de IL-12.

O controlo da leishmaniose está dependente do recrutamento de células T específicas aos locais de infecção (Murray, 2000, Gomes-Pereira *et al*, 2004b). Neste estudo as fracções High e Low revelaram um potencial profilático para a infecção por *Leishmania*, estimulando simultaneamente as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> a coordenar uma resposta do tipo Th1/Tc1 em duas estirpes de murganhos com diferentes características genéticas. A produção de IL-12 pelas células T, necessária para a indução e persistência de imunidade protectora (Mattner *et al*, 1997, Scott, 2003), direcciona a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> “naive” em células com um fenótipo Th1 (O’Garra & Arai, 2000), bem

como o predomínio de uma resposta do tipo Th1 (Park *et al*, 2002). Nesse sentido investigadores demonstraram as vantagens da adição de IL-12 a produtos candidatos a vacinas para a leishmaniose (Afonso *et al*, 1994, Yamakami *et al*, 2001). A actividade citotóxica das células T pode efectivar-se através da produção de citocinas, como IFN $\gamma$  e de TNF- $\alpha$ , e da lise da célula infectada pela acção directa da perforina ou através de regulação positiva de Fas-L (CD95L) que incia o programa da morte celular (Berke, 1995). O potencial citotóxico das células CD8<sup>+</sup> nas infecções por *Leishmania* continua relativamente pouco conhecido. Havendo estudos que apontam para a inexistência de um papel preponderante na regulação da sobrevivência do parasita (Smith *et al*, 1991), enquanto que outros sugerem o desempenho de um papel importante na resposta imunológica protectora em infecções originadas por espécies de *Leishmania* dermatrópicas (Conceição-Silva *et al*, 1998, Huang *et al*, 1998, Colmenares *et al*, 2003). Adicionalmente, num trabalho anterior efectuado pelo nosso grupo foi também verificado que as células CD8<sup>+</sup> de memória aumentavam durante a diminuição da multiplicação parasitária no fígado de murganhos com fenótipo cura (Gomes-Pereira *et al*, 2004b). No presente trabalho, a imunização com a fracção Low parece ter contribuído igualmente para o envolvimento das células CD8<sup>+</sup> na manutenção da imunidade protectora contra *L. infantum*.

Nos murganhos C57BL/6 a eliminação das células CD4<sup>+</sup> (subpopulação CD4<sup>-</sup>) não causou alterações nos níveis de proliferação mas conduziu ao aumento da expressão de IL-12 quando estimuladas pelos diferentes antígenos, um mês após a inoculação dos parasitas. No entanto, apenas a fracção High induziu simultaneamente a expressão e libertação de IL-12 e de IFN $\gamma$ , facto que não se manteve quando a carga parasitária diminuiu. A produção de IL-12 parece estar associada à presença das células CD8<sup>+</sup>. Também nos murganhos BALB/c a ausência das células CD4<sup>+</sup> não alterou a incapacidade dos linfócitos proliferar na presença dos diferentes antígenos. Não obstante, as fracções High e Low estimularam estas células a expressar significativamente IL-12 e IFN $\gamma$ , um mês após o início da infecção. Estas fracções têm a capacidade de induzir as células CD4<sup>-</sup> dos murganhos BALB/c a expressarem citocinas do tipo Th1. Este padrão de expressão de citocinas pode ser devido às células CD8<sup>+</sup>, que



se encontram incluídas nesta fracção celular, sobretudo quando estimuladas pela fracção Low.

A ausência das células  $CD8^+$  do conjunto das células mononucleares do baço de murganhos BALB/c também não causou alteração na proliferação. Mas a acção das diferentes fracções proteicas mostrou-se diversificada. No início da infecção a fracção High causou aumento de expressão de IL-10 e IL-4 e produção de IFN $\gamma$  e IL-4. Enquanto que no final do período de observação a fracção High estimulou a expressão de IL-12 e manteve a produção de IFN $\gamma$  e IL-4 acrescida de IL-10 e as fracções Inter e Low induziram a libertação de IL-10.

Nestes animais, a eliminação das células  $CD8^+$  levou à indução de uma resposta mista Th1/Th2 quando estimuladas pela fracção High durante todo o período de observação, enquanto que no final deste as fracções Inter e Low induziram a apresentação de uma resposta Th2. Estas observações não parecem ser explicadas pelo comportamento das células  $CD4^+$  incluídas nesta fracção celular.

No início da infecção as células  $CD8^-$  de murganhos C57BL/6 revelaram níveis elevados de mRNA de IFN $\gamma$  na presença das fracções High e Low, contudo apenas se verificou libertação desta citocina pelas células estimuladas pela fracção High. As três fracções proteicas também causaram a libertação de quantidades apreciáveis de IL-10.

No final do período de observação a fracção Low induziu as células  $CD8^-$  dos murganhos C57BL/6 a expressar níveis superiores de mRNA de IL-12 e de IL-10, porém a estimulação adicional com as três fracções proteicas e com o Ag induziram as células a libertarem IL-12. A libertação de quantidades apreciáveis de IFN $\gamma$  e de IL-10 foi induzida pelas três fracções proteicas. A estimulação com a fracção High das células mononucleares do baço de murganhos C57BL/6 na ausência das células  $CD8^+$  levou à indução de uma resposta mista Th1/Th2, com produção de IFN $\gamma$  e IL-10, enquanto que as fracções High e Low induziram as células  $CD8^-$  a apresentarem uma resposta Th2. Com a restrição da multiplicação parasitária as células passaram a exhibir uma resposta mista Th1/Th2 quando estimuladas pelas três fracções, associada à libertação de IL-12. A produção de IL-12 pode ser, em grande parte, explicados pelo comportamento das células  $CD4^+$ .

Resumidamente, nos murganhos BALB/c o início da infecção é caracterizado por uma produção específica de citocinas pouco acentuada, predominando a libertação de IL-12. Com o aumento da carga parasitária, as células exibem uma resposta mista Th1/Th2, com produção de IL-12 generalizada aos diferentes grupos celulares. Nos murganhos C57BL/6, logo de início as subpopulações celulares mostram-se bastante activas, libertando sobretudo IL-12, com excepção das CD8<sup>+</sup>. Com a restrição da multiplicação parasitária, a produção de citocinas permanece inalterada, à excepção do aumento da produção de IFN $\gamma$  pelas células CD8<sup>+</sup>.

Apesar de não haver um padrão constante durante a evolução da infecção nas duas estirpes de murganhos, as fracções High e Low foram as que consistentemente causaram a expressão e produção de citocinas protectoras, nomeadamente IFN $\gamma$  e IL-12 pelas diferentes subpopulações estudadas, sem darem origem a libertação excessiva de IL-10 ou IL-4. Estas fracções proteicas parecem ser as que apresentam maiores propriedades profiláticas, ou que em muitos casos foram as mais imunogénicas, tendo sido escolhidas para os estudos de imunização. Os resultados obtidos também sugerem que as fracções proteicas High e Low são imunorreconhecidas por hospedeiros com características genéticas diferentes que predeterminam a capacidade do sistema imunológico de controlar a infecção ou, pelo contrário, permitem que o parasita se evada aos mecanismos imunológicos defensivos.

As infecções causadas por espécies de *Leishmania* viscerais ou dermatotropicas podem evoluir para formas subclínicas ou originar lesões autolimitantes. Os indivíduos que apresentam estes quadros clínicos desenvolvem imunidade contra *Leishmania* e estão protegidos contra a re-infecção (Melby, 1991). A capacidade de controlar a infecção causada por este parasita é mediada pela resposta imunológica do tipo Th1 com activação macrofágica dependente da produção de IFN $\gamma$  (Kemp, 1997). A emergência da LV como doença oportunista em indivíduos infectados com HIV salienta a importância das células T CD4<sup>+</sup> no desenvolvimento da imunidade protectora contra *Leishmania* (Alvar et al, 1997). No seu conjunto estes dados sugerem que é possível desenvolver vacinas para as leishmanioses capazes de induzir a resposta imunológica mediada por células. De facto, a infecção deliberada com tecidos provenientes de doentes com leishmaniose cutânea ou com promastigotas de cultura de *L. major*

(Leishmanização) tem resultado em níveis elevados de protecção (Modabber, 1989). Contudo, esta prática não é recomendada devido a razões de segurança associado à injeção de organismos vivos e virulentos (Jaffe, 1999).

Os linfócitos do baço dos quatro grupos de murganhos BALB/c imunizados com as fracções High e Low deixaram de se apresentar imunossuprimidas pela infecção por *L. infantum*. Este facto traduziu-se pela forte resposta proliferativa observada para ambas as fracções proteicas utilizadas e para o antígeno total. Comportamento semelhante, ainda que menos acentuado, foi também verificado nos animais imunizados e saudáveis o que sugere a existência de memória específica. Também a diminuição da carga parasitária observada, particularmente no caso dos animais imunizados com a fracção Low, em relação aos animais não imunizados, é um forte indicador da acção das fracções proteicas utilizadas nestes animais.

Nos murganhos imunizados com a fracção High e infectados com *L. infantum*, a estimulação adicional com as fracções High e Low induziu um aumento da expressão de IFN $\gamma$  nas células CD4<sup>+</sup> e simultaneamente, uma diminuição significativa da expressão de IL-10 e IL-4. Este aumento na expressão foi acompanhado pela produção de níveis consideráveis de IL-12 e IFN $\gamma$ , bem como uma diminuição significativa da libertação de IL-10 e IL-4. Os resultados indicam que as células CD4<sup>+</sup> apresentaram claramente uma resposta do tipo Th1 (protectora) com produção de IFN $\gamma$  e simultaneamente de IL-12. Nas células CD8<sup>+</sup> destes animais foi observado um aumento do número de cópias de mRNA de IL-12 e uma diminuição da expressão de IL-4 induzido pelas fracções High e Low. No entanto, as quantidades produzidas das citocinas foram sempre reduzidas. Estas observações sugerem que ambas as fracções proteicas foram reconhecidas pelas células CD8<sup>+</sup> dos murganhos BALB/c imunizados com a fracção High e infectados. Este reconhecimento traduziu-se apenas pela expressão de IL-12, uma vez que parece existir uma forte regulação da produção de citocinas.

As células CD4<sup>-</sup> dos murganhos BALB/c imunizados com a fracção High e infectados apresentaram aumento da expressão de IL-12 e IFN $\gamma$  quando estimuladas pelas fracções High e Low, acompanhada por uma diminuição considerável do número de cópias de

mRNA de IL-4. A fracção High induziu a libertação de quantidades elevadas de IL-12 e IFN $\gamma$ . Também a fracção Low e o Ag incrementaram fortemente a produção de IFN $\gamma$ . Cultivadas com as duas fracções proteicas, as células CD4<sup>+</sup> destes murganhos mostraram uma diminuição significativa dos níveis de IL-10 e IL-4 libertados. No seu conjunto, estes resultados indicam que apesar da ausência das células CD4<sup>+</sup> as células mononucleares apresentaram uma resposta do tipo Th1 com produção simultânea de IL-12 nas células estimuladas com a fracção High. No entanto, a produção destas citocinas não parece ser devida ao comportamento das células CD8<sup>+</sup>.

Na ausência da células CD8<sup>+</sup>, as células mononucleares dos murganhos BALB/c imunizados com a fracção High e infectados revelaram aumentos na expressão de IL-12 e IFN $\gamma$ , bem como uma forte diminuição do número de cópias de mRNA de IL-4, quando estimuladas por ambas as fracções proteicas. Contudo as citocinas produzidas foram diferentes de acordo com o tipo de antígenos usados na estimulação. Assim, as fracções High e Low previligiaram a produção de IFN $\gamma$  e a fracção Low a libertação de IL-12. De modo idêntico as duas fracções proteicas reduziram a produção de IL-10 e de IL-4. Estas observações indicam ambas as fracções proteicas induziram as células CD8<sup>+</sup> a elaborarem uma resposta Th1, mas apenas a fracção Low causou a libertação de IL-12. Esta subpopulação celular inclui as células CD4<sup>+</sup> que podem ter contribuído para a produção de IL-12.

A infecção por *L. infantum* causa nos hospedeiros vertebrados naturais (homem, cão) e laboratoriais (murganhos, hamsters) imunossupressão da proliferação linfocitária específica (Carvalho *et al*, 1985, Cabral *et al* 1998, Leandro *et al*, 2001, Santos-Gomes *et al*, 2002, Riça Capela *et al*, 2003) com dispersão do parasita pelos órgãos internos e, no caso do cão, pelo tecido cutâneo.

No seu conjunto, os resultados obtidos neste estudo indicam que a imunização com a fracção High, para além de causar redução na carga parasitária do baço e de abolir a incapacidade de as células proliferarem, também contribuiu para o predomínio de uma resposta protectora ao nível da subpopulações celulares CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> quando estimulados com a mesma fracção proteica. Para além disso, a imunização com fracção High causou também o reconhecimento pelas células de outra fracção proteica libertada

pelo parasita, a fracção Low. Esta fracção proteica desencadeou uma resposta imunológica muito próxima da exibida pelas células estimuladas pela fracção High. Por outro lado, a imunização dos animais também alterou a resposta ao antígeno parasitário (Ag) com o aumento de produção de IFN $\gamma$  pelas células CD4 $^{+}$  e CD8 $^{+}$ .

Nos murganhos BALB/c imunizados com a fracção Low e infectados verificou-se um aumento da expressão de IL-12 nas células CD4 $^{+}$  estimuladas pela fracção homóloga e de IFN $\gamma$  induzido pelas duas fracções proteicas. O número de cópias de mRNA de IL-10 e IL-4 também sofreu redução na presença das fracções proteicas. Nas células CD8 $^{+}$  verificou-se redução da expressão de IL-10, induzido pelas fracções High e Low. Em ambas as subpopulações celulares a estimulação adicional pelas fracções causou a libertação de níveis elevados de IL-12 na presença de IFN $\gamma$  e de quantidades mínimas de citocinas do tipo Th2.

Os resultados indicam que as células CD4 $^{+}$  e CD8 $^{+}$  dos murganhos BALB/c imunizados com a fracção Low e infectados produzem, após estimulação adicional com a mesma fracção proteica, quantidades apreciáveis de IL-12 associado ao predomínio de uma resposta Th1/Tc1.

Nos animais imunizados com a fracção Low e infectados a ausência das células CD4 $^{+}$  causou um aumento considerável do número de cópias de mRNA de IFN $\gamma$ , quando estimuladas pela fracção homóloga, e diminuição da expressão de IL-10 e IL-4 que foi acompanhada por produção de grande quantidade de IFN $\gamma$ . A fracção High também causou o aumento de expressão de IFN $\gamma$  e o decréscimo de IL-10 e IL-4 sem que se tenha verificado incrementos na produção destas citocinas.

A imunização com a fracção Low, seguida pela estimulação celular com a mesma fracção proteica induziu a subpopulação celular CD4 $^{+}$  a apresentar uma resposta do tipo Th1 que não parece espelhar o comportamento das células CD8 $^{+}$ .

As células CD8 $^{+}$  destes animais mostraram um aumento significativo da expressão de IL-12 e IFN $\gamma$ , e uma diminuição do número de cópias de mRNA de IL-10 e IL-4 quando induzidas pelas fracções High e Low. A fracção Low incrementou a produção de níveis elevados de IL-12 e IFN $\gamma$ , bem como uma redução das quantidades libertadas de IL-10 e IL-4. A fracção High estimulou estas células a produzirem significativamente IL-12 e provocou uma diminuição dos níveis de libertação de IL-10. Os resultados obtidos

permitem concluir que na ausência de células CD8<sup>+</sup> os linfócitos do baço dos murganhos imunizados com a fracção Low evidenciaram uma resposta do tipo Th1 quando exogenamente estimuladas pela fracção proteica homóloga. Estes resultados podem ser, em grande parte, explicados pelas células CD4<sup>+</sup> que estão incluídas nesta fracção celular.

A imunização de murganhos BALB/c com a fracção Low teve como consequência a acentuada redução na carga parasitária do baço, ao mesmo tempo que restaurou a capacidade das células linfoproliferarem, evidenciado memória específica para aquele antígeno. Para além disso, a análise isolada das subpopulações linfocitárias revelou o predomínio da libertação de IL-12, que tem sido associada à apresentação antigénica, à diferenciação de linfócitos Th1 e à constituição de células de memória (Gorak *et al*, 1998, Belkaid *et al*, 2001), e de IFN $\gamma$  que é considerado uma citocina protectora. Adicionalmente, a activação celular foi acompanhada pela regulação negativa da produção de citocinas associadas à evolução da doença, como a IL-10 e IL-4 (Heinzel *et al*, 1991, Kopf *et al*, 1996, Launois *et al*, 1997). De modo diverso ao que tinha sido verificado com a fracção High, a imunização com a fracção Low não parece contribuir para que as células tenham uma resposta predominantemente Th1 aos outros antígenos estudados. Confirma-se assim que os linfócitos têm sensibilidades diferentes a antígenos diversos resultando padrões de citocinas únicos, que no caso específico das fracções proteicas libertadas por *Leishmania* tem certamente consequências no decurso da infecção. O modo de evolução da infecção no hospedeiro estará provavelmente dependente do conjunto de antígenos parasitários disponíveis, assim como, do conjunto de respostas imunológicas desencadeadas pelas células T a cada um desses antígenos. Uma resposta protectora terá necessariamente que originar um conjunto de células T específicas cuja acção force o parasita a manter-se em latência ou contribua para a sua total eliminação.

Pela análise das experiências descritas, pôde confirmar-se o interesse da utilização das fracções High e Low como ferramentas imunoprofiláticas para a LVZ. No entanto, vários outros estudos serão necessários para identificar as sequências proteicas incluídas nas fracções High e Low.

Para tal será necessário separar os diferentes péptidos incluídas nas referidas fracções, utilizando, por exemplo, a técnica de electroforese de duas dimensões ou análise por HPLC, de seguida proceder à sua sequenciação e finalmente identificá-las por comparação no “Gene Bank” com o genoma de *Leishmania*. O conhecimento da estrutura das fracções proteicas utilizadas neste estudo evitará a sua obtenção através de meios de cultura seguido de isolamento, que é um trabalho bastante demorado, oneroso e de reduzida eficiência.

Por outro lado, dever-se-á continuar as experiências com os murganhos, fazendo variar as condições de imunização, desde ao tamanho das doses à frequência e intervalo de tempo entre as imunizações e ao uso de adjuvantes numa tentativa de otimizar a eficiência da vacinação. Seria também importante confirmar a durabilidade da memória específica, que no presente trabalho foi analisada durante um período de tempo relativamente curto, aumentando o tempo de observação e/ou recorrendo a experiências de transferência celular para animais saudáveis.

Outro dos estudos que se impõe fazer, seria caracterizar a acção destas fracções proteicas ao nível dos macrófagos, nomeadamente a activação da respiração oxidativa e, finalmente, um dos passos de maior interesse seria analisar a resposta imunológica induzida por estas fracções no modelo canino e em humanos. Num trabalho recente efectuado por Holzmüller e colaboradores (2005) foi verificado que cães imunizados com antígenos excretados/secretados de *L. infantum* apresentam imunidade celular específica com produção de IFN $\gamma$  e activação macrofágica evidenciada pela presença de NO e destruição dos amastigotas.

## **BIBLIOGRAFIA**



## BIBLIOGRAFIA

Abdi K. (2002) IL-12: the role of p40 versus p75. *Scandinavian Journal of Immunology* **56**, 1-11

Abranches P., (1986) Ecologia das leishmaníases. *O Médico* **195**, 1026-1037

Abranches P., (1989) Reservoirs of visceral leishmaniasis. In: *Leishmaniasis. The current Status and New Strategies for Control*. Hart D.T. (Ed.), Plenum Press, London, 61-70

Abranches P., Pires, C.A. (1980). O Kala-Azar em Portugal. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, **3**: 203-217

Abranches P., Campino L., Santos-Gomes G.M. (1998) Leishmaniose canina: Novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controlo da leishmaniose visceral humana. *Acta Médica Portuguesa* **11**, 871-875

Abranches P., Conceição-Silva F.M., Silva-Pereira M.C.D. (1984) Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrábida. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **87**, 197-200

Abranches P., Pires C.A., Conceição-Silva F.M., Silva-Pereira M.C.D., Gomes G.M.S. (1987) O kala azar em Portugal. VI. Inquérito epidemiológico realizado na Região Metropolitana de Lisboa: Interpretação da estrutura e dinâmica do foco endémico. *Jornal da Sociedade das Ciências Médicas de Lisboa* **151**, 364-379

Abranches P., Ribeiro M.M.S., Lopes F.J., Gomes L.T. (1983b) O kala-azar em Portugal. II. Inquérito sobre a leishmaniose canina em Alcácer do Sal. *Jornal das Ciências Médicas* **147**, 147-149

Abranches P., Sampaio-Silva M.L., Santos-Gomes G.M., Avelino I.C., Pires C.A., Conceição-Silva F.M., Seixas-Lopes A., Silva-Pereira M.C.D., Janz J.G. (1992) Kala-azar in Portugal. VII. Epidemiological survey in Alijó (endemic region of Alto Douro). *Research and Reviews in Parasitology* **52**, 121-124

Abranches P., Santos-Gomes G., Campino L. (1993) Epidemiology of leishmaniasis in Portugal. *Archives de L'Institut Pasteur de Tunis* **70**, 349-355

- Abranches, P., Santos-Gomes, G., Rachamim, N., Campino, L., Schnur, L.F., Jaffe, C.L. (1991b) An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*. **13**, 537-550
- Abranches P., Silva-Pereira M.C.D., Conceição-Silva F.M., Santos-Gomes G.M., Janz J.G. (1991a) Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *Journal of Parasitology* **77**, 557-561
- Adler S., Gunders A. E. (1964) Secretion of antigen in cultures of Leptomonades and Hamsters infected with *Leishmania*. *Journal of Protozoology*, suppl. **11**, 42.
- Afonso L.C., Scharton T.M., Vieira L.Q., Wysocka M., Trinchieri G., Scott P. (1994) The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* **263**, 235-237
- Aga E., Katschinski D.M., Zandbergen G., Laufs H., Hansen B., Müller W., Laskay T. (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of Immunology* **169**, 898-905
- Aguar S. (1970) Botão do Oriente em Portugal. *Gazeta Sanitária* **19**, 193-195
- Ahmed S., Colmenares M., Soong L., Goldsmith-Pestana K., Munstermann L., Molina R., McMahon-Pratt D. (2003) Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity* **71**, 401-410
- Akuffo H., Alexis A., Eidsmo L., Saed A., Nylen S., Maasho K. (1999) Natural killer cells in cross-regulation of IL-12 by IL-10 in *Leishmania* antigen-stimulated blood donor cells. *Clinical Experimental Immunology* **117**, 529-34
- Akiyama H.J., Haight R.D. (1971) Interaction of *Leishmania donovani* and hamster peritoneal macrophages. A phase-contrast microscopical study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **20**, 539-545
- Alexander J., Russell D.G. (1992) The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Advances in Parasitology* **31**, 175-254
- Allen P.M., Babbitt B.P., Unanue E.R. (1987) T cell recognition of lysosome: the biochemical basis of presentation. *Immunology Reviews* **98**, 171-187

Almeida M.C., Vilhena V., Barral A., Barral-Netto M. (2003) Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **98**, 861-870

Alvar J., Canavate C., Gutierrez-Solar B., Jimenez M., Laguna F., Lopez-Velez R., Molina R., Moreno J. (1997) Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews* **10**, 298-319

Alvar, J., Molina, R., Andrés, M.S., Tesouro, M., Nieto, J., Vitutia, M., Gonzalez, F., Andrés, M.D.S., Boggio, J., Rodriguez, F., Sainz, A., Escacena, C. (1994) Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **88**, 371-378

Alvar J., Jiménez M. (1994) Could infect drug-users be potencial *Leishmania infantum* reservoirs? *AIDS* **8**, 854

Álvares D., Silva E.P. (1911) Sobre a frequência do kala-azar nos cães de Lisboa. *Medical Conference* **14**, 97

Andersen P. (1994) Effective vaccination of mice against *Micobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted micobacterial proteins. *Infection and Immunity*, **62**, 2536-2544

Andersen P., Askgaard D., Ljungqvist L., Bennedsen J., Herun I. (1991) Proteins released from *Micobacterium tuberculosis* during growth. *Infection and Immunity*, **59**, 1905-1910

Andresen K., Gasim S., Elhassan A.M., Khalil E.A.G., Barker D.C., Theander T.G., Kharazmi A. (1997) Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. *Tropical Medicine and International Health* **2**, 440-444

Asher F., Pires C.A., Capela M.J., Aguiar P. (1997) Effect protecteur d'un spray insecticide contre *Phlebotomus perniciosus* vecteur de leishmaniose. *Conference Nationale des Vétérinaires Spécialisées en Petits Animaux*. C.N.V.S.P.A., 22 Novembro, Paris

Ashford R.W., Bettini S. (1987) Ecology and Epidemiology: Old World. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology*. Peters W., Killick-Kendrick R. (Eds.), Academic Press, New York, Vol.I, 365-424

- Ashford R.W., Dejeux P., deRaadt P. (1992) Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today* **8**, 104-105.
- Assreuy J., Cunha F.Q., Epperlein M., Noronha-Dutra A., O'Donnell C.A., Liew F.Y., Moncada S. (1994) Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *European Journal of Immunology* **24**, 672-676
- Atasoy U., Curry S.L., Lopez de Silanes I., Shyu A.B., Casolaro V., Gorospe M., Stellato C. (2003) Regulation of eotaxin gene expression by TNF-alpha and IL-4 through mRNA stabilization: involvement of the RNA-binding protein HuR. *Journal of Immunology* **171**, 4369-4378
- Azevedo, J.F. (1960). Sobre o diagnóstico do kala-azar. *Jornal do Médico*, **43**: 265-272
- Azevedo J.F., Neves V.M. (1963) La leishmaniose canine à Lisbonne. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **38**, 741-755
- Azevedo J.F., Teixeira A.W.G. (1947) Sobre a infestação por leishmanias nos cães de Lisboa. *Anais do Instituto de Medicina Tropical* **4**, 99-106
- Bacellar O., Brodskyn C., Guerreiro J., Barral-Netto M., Costa C.H., Coffman R.L., Johnson W.D., Carvalho E.M. (1996) Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* **173**, 1515-1518
- Bahr, V., Stierhof, Y.D., Ilg, T., Demar, M., Quinten, M., Overath, P. (1993) Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *Molecular and Chemical Parasitology*, **58**, 107-122
- Bancroft G.J. (1993) The role of natural killer cells in innate resistance of infection. *Current Opinion in Immunology* **5**, 503-510
- Bancroft G.J., Schreiber R.D., Unanue E.R. (1991) Natural immunity: a T-cell independent pathway of macrophage activation, defined in the SCID mouse. *Immunology Reviews* **124**, 5-24
- Bandyopadhyay K., Karmarkar S., Ghosh A., Das P.K. (2002) High affinity binding between laminin and laminin binding protein of *Leishmania* is stimulated by zinc and may involve laminin zinc-finger like sequences. *European Journal of Biochemistry* **269**, 1622-1629.

- Barbosa W., Pinheiro Z.B., Oliveira R.L. (1973) Electroimunodifusão no diagnóstico do calazar com os antígenos de *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis*, *Leptomonas pessoai*. Resultados preliminares. *Revista de Patologia Tropical* **4**, 377-386
- Barral A., Barral-Neto M., Yong E.C., Brownell C.E., Twardzik D.R., Reed S.G. (1993) TGF- $\beta$  as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **90**, 3442-3446
- Bates P.A. (1994) The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology* **79**, 215-218
- Bates P. A., Hermes I., Dwyer D. M. (1990) Golgi mediated post-translational processing of secretory acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **39**, 247-255.
- Beach R., Kiilu G., Leeuwenburg J. (1985) Modification of sand fly biting behaviour by *Leishmania* leads to increased parasite transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **34**, 278-282
- Belazzoug S., Lanotte G., Maazoun R., Pratlong F., Rioux J.A. (1985) Un nouveau variant enzymatique de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent de la leishmaniose cutanée du Nord de l'Algérie. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **60**, 1-3
- Belkaid Y., Kamhawi S., Modi G., Valenzuela J., Noben-Trauth N., Rowton E., Ribeiro J., Sacks D.L. (1998) Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and sandfly preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 1941-1943
- Belkaid Y., Mendez S., Lira R., Kadambi N., Milon G., Sacks D. (2000) A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of Immunology* **165**, 969-977
- Belkaid Y., Hoffmann K.F., Mendez S., Kamhawi S., Udey M.C., Wynn T.A., Sacks D.L. (2001) The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *Journal of Experimental Medicine* **194**, 1497-1506

Belkaid Y., Piccirillo C.A., Mendez S., Shevach E.M., Sacks D.L. (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* **420**, 502-507

Berhe N., Hailu A., Gemetchu T. (1995) Human immunodeficiency virus and recurrence of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania aethiopica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **89**, 400-401

Berke, G. (1995) The CTL's kiss of death. *Cell* **81**, 9-12

Bertho A.L., Santiago M.A., Da-Cruz A.M., Coutinho S.G. (2000) Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **33**, 317-325

Bettini S., Pozio E., Gradoni L. (1980) Leishmaniasis in Tuscany (Italy) (II): *Leishmania* from wild Rodentia and Carnivora in a human and canine leishmaniasis focus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **74**, 77-83

Bettini S., Gramiccia M., Gradoni L., Biggio P., Loi R., Cottoni F., Pau M., Atzeni M.C. (1990) Leishmaniasis in Sardinia. IV. Epidemiological appraisal of cutaneous leishmaniasis and biochemical characterization of isolates. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **93**, 262-269

Beverly S.M., Turco S.J. (1998) Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends in Microbiology* **6**, 35-40

Bidri M., Ktorza S., Vouldoukis I., Le Goff L., Debre P., Guillosson J.J., Arock M. (1997) Nitric oxide pathway is induced by FcεRI and upregulated by stem cell factor in mouse mast cells. *European Journal of Immunology* **27**, 2907-2913

Blackburn K., Wallbanks K.R., Molyneux D.H., Lavin D.R., Winstanley S.L. (1988) The peritrophic membrane of the female sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **82**, 613-619

Blanchette J., Racette N., Faure R., Siminovitch K., Olivier M. (1999) *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *European Journal of Immunology* **29**, 3737-3744

- Blank C., Fuchs H., Rappersberger K., Rollinghoff M., and Moll H. (1993) Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *Journal of Infectious Diseases* **167**, 418-425
- Blank C., Bogdan C., Bauer C., Erb K., and Moll H. (1996) Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Immunology* **26**, 792-796
- Blum J.J., Opperdoes F.R. (1994) Secretion of sucrase by *Leishmania donovani*. *Journal of Eukariotic Microbiology*, **41**, 228-231.
- Bogdan C., Donhauser N., Döring R., Röllinghoff M., Diefenbach A., Rittig M.G. (2000) Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine* **191**, 2121-2130
- Bogdan C., Nathan C. (1993) Modulation of macrophage functions by transforming growth factor- $\beta$ , interleukin 4 and interleukin 10. *Annals of New York Academy of Science* **685**, 713-739
- Bogdan C., Röllinghoff M. (1998) the immune responses to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology* **28**, 121-134
- Bogdan C., Röllinghoff M., Solbach W. (1990) Evasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitology Today* **6**, 183-187
- Borja-Cabrera G.P., Cruz Mendes A., Paraguai de Souza E., Hashimoto Okada L.Y., de A Trivellato F.A., Kawasaki J.K., Costa A.C., Reis A.B., Genaro O., Batista L.M., Palatnik M., Palatnik-de-Sousa C.B. (2004) Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine* **22**, 2234-2243
- Borja-Cabrera G.P., Paraguai de Souza P., Bernardo R., Palatnik-de-Sousa C. (1997) Early humoral response in Mongrel dogs vaccination with FML antigen of *L. donovani* in combinations with saponin adjuvants. *Acta Parasitologica Turcica* **21** (supl. 1), 33
- Bray R.S. (1983) *Leishmania*: chemotactic responses of promastigotes and macrophages *in vitro*. *Journal of Protozoology* **30**, 322-329
- Bray R. S., Laison R. (1966) The immunology and serology of leishmaniasis. IV. Results of Ouchterlony double diffusion tests. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **60**, 605-609

- Brittingham A., Morrison C.J., McMaster W.R., McGwire B.S., Chang K-P., Mosser D.M. (1995) Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of Immunology* **155**, 3102-3111
- Brittingham A., Mosser D.M. (1996) Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitology Today* **12**, 444-447
- Brown J.A., Titus R.G., Nabavi N., Glimcher L.H. (1996) Blockade of CD86 ameliorates *Leishmania major* infection by down-regulating the Th2 response. *The Journal of Infectious Diseases* **174**, 1303-1308
- Bryceson A.D.M. (1996) Leishmaniasis. In: *Manson's Tropical Diseases*. 20th ed. Cook G.C. (Ed.), W.B. Saunders Company, London, 1755 pp.
- Buates S., Matalashewski G. (2001) General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *Journal of Immunology* **166**, 3416-3422
- Buffet P.A., Sulahian A., Garin Y.J., Nassar N., Derouin F. (1995) Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **39**, 2167-2168
- Butler N.S., Monick M.M., Yarovinsky T.O., Powers L.S., Hunninghake O. (2002) Altered IL-4 mRNA stability correlates with Th1 and Th2 biases and susceptibility to hypersensitivity pneumonitis in two inbred strains of mice. *Journal of Immunology* **169**, 3700-3709
- Cabral M., O'Grady J., Alexander J. (1992) Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunology* **14**, 531-539
- Cabral M., O'Grady J.E., Gomes S., Sousa J.C., Thompson H., Alexander J. (1998) The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology* **76**, 173-180
- Campino L. (1991) Aplicação de duas técnicas sero-imunológicas: Imunofluorescência indirecta (IFI) e Contraímuno-electroforese (CIE) no estudo da leishmaniose visceral: *Provas de aptidão pedagógica e capacidade científica*. Universidade Nova de Lisboa, 75 pp.



Campino L. (1998) Leishmanioses em Portugal. Características emergentes da epidemiologia e do diagnóstico. *Tese*. Universidade Nova de Lisboa, 192 pp.

Campino L, Abranches P. (2002) Leishmaniose cutânea. Uma doença rara em Portugal? *Acta Médica Portuguesa* **15**, 387-390

Campino L., Capela M.J., Maurício I.L., Ozensoy S., Abranches P. (1995) O kala-azar em Portugal. IX. A região do Algarve: Inquérito epidemiológico sobre o reservatório canino no concelho de Loulé. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* **18**, 189-194

Campino L., Cortes S., Pires R., Oskam L., Abranches P. (2000a) Detection of *Leishmania* in immunocompromised patients using peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **19**, 396-398

Campino L., Pratlong F., Antunes F., Maurício I., Dedet J.P., Abranches P. (1997) HIV/*Leishmania* coinfections in Portugal: diagnosis and isoenzyme characterization of *Leishmania*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **91**, 433-436

Campino L., Santos-Gomes G.M., Pratlong F., Dedet J.P., Abranches P. (1994a) HIV-*Leishmania* coinfection in Portugal: isolation of *Leishmania infantum* MON-24. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **88**, 394

Campino L., Santos-Gomes G.M., Pratlong F., Dedet J.P., Abranches P. (1994b) The isolation of *Leishmania donovani* MON-18, from an AIDS patient in Portugal: possible needle transmission. *Parasite* **1**, 391-392

Cardoso L., Rodrigues M., Santos H., Schoone G.J., Carreta P., Varejao E., van Benthem B., Afonso M.O., Alves-Pires C., Semiao-Santos S.J., Rodrigues J., Schallig H.D. (2004) Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology* **121**, 21-32

Carrera L., Gazzinelli R.T., Badolato R., Hieny S., Muller W., Kuhn R., Sacks D.L. (1996) *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *Journal of Experimental Medicine* **183**, 515-526

- Carvalho E.M., Badaro R., Reed S.G., Jones T.C., Johnson W.D. Jr. (1985) Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Investigation* **76**, 2066-2069
- Carvalho E.M., Barral A., Pedral-Sampaio D., Barral-Netto M., Badaro R., Rocha H., Johnson W.D. Jr. (1992) Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *Journal of Infectious Diseases*. **165**, 535-40
- Chagas E., Cunha A.M., Ferreira L.C., Deane L., Deane G., Guimarães F.N., Paumgartten M.J., Sá B. (1938) Leishmaniose visceral americana (Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **33**, 89-229
- Chan M.M., Grogl M., Callahan H., Fong D., (1995) Efficacy of the herbicide trifluraline against four P-Glycoprotein-expressing strains of *Leishmania*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 1609-1611
- Chan J., Fujiwara T., Brennan P., McNeil M., Turco S.J., Sibille J.C., Snapper M., Aisen P., Bloom B.R. (1989) Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **86**, 2453-2457
- Chang K-P. (1981) Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Experimental Parasitology* **55**, 377-385
- Chang K-P. (1993) Evolution and regulation of *Leishmania* virulence. In *Current Trends. In: Leishmania Research*. Bhaduri, A.N., Basu, M.K., Sen, A.K., Kumar, S. (Eds.). CSIR. Publications & Informations Directorate, New Delhi, Índia, 15-27
- Chang K-P (2003) In *Modern Parasite Biology*, editado por D.J. Wyler, [www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/kinet.html](http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/kinet.html), consultado a 11 de Janeiro de 2005.
- Chatelain R., Varkila K., Coffman R.L. (1992) IL-4 induces a Th2 response in *L. major*-infected mice. *Journal of Immunology* **148**, 1182-1187
- Chaudhuri, G., Chang, K.P., (1988) Acid protease activity a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **27**, 43-52

- Chen D.Q., Kolli B.K., Yadava N., Lu H.G., Gilman-Sachs A., Peterson D.A., Chang K.P. (2000) Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages *in vitro*. *Infection and Immunity* **68**, 80-86
- Cibrelus P., Precigout E., Sereno D., Carcy B., Lemesre J.L., Gorenflot A. (1999) Secreted antigens of the amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum* inducing a humoral response in humans and dogs. *Parasite*. **6**, 121-129
- Cliton B. A., Palczuk N. C., Stauber L. A. (1972) *Leishmania donovani*: Partial characterization of some flagellate cytoplasmic immunogene. *Journal of Immunology*, **108**, 1570-1577
- Colmenares M., Kima P. E., Samoff E., Soong L., McMahon-Pratt D. (2003) Perforin and Gamma Interferon Are Critical CD8<sup>+</sup> T-Cell-Mediated Responses in Vaccine-Induced Immunity against *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity* **71**, 3172-3182
- Conceicao-Silva, F., M. Hahne, M. Schroter, J. Louis, and J. Tschopp. (1998) The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *European Journal of Immunology* **28**, 237-245
- Constant S., Pfeiffer C., Woodard A., Pasqualini T., Bottomly K. (1995) Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4<sup>+</sup> T cells. *Journal of Experimental Medicine* **182**, 1591-1596
- Cortes S., Rolão N., Ramada J., Campino L. (2004) PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **98**, 12-17
- Costa J.M.C., Neogy A.B., Vouldoukis I., Silva M.L.S., Gentillini M., Monjour L. (1996) Antigenic components of partially purified antigens of *Leishmania donovani infantum* recognized by sera from dogs with asymptomatic or active visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **55**, 511-515
- Courret N., Prina E., Mougneau E., Saraiva E.M., Sacks D.L., Glaichenhaus N., Antoine J.C. (1999) Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of phagocytosed parasites. *European Journal of Immunology* **29**, 762-773

Cox F. E. (1997) Designer vaccines for parasitic diseases. *Internacional Journal of Parasitology* **10**: 1147-1157

Croft M., Dubey C. (1997) Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Critical Review in Immunology* **17**, 89-118

Cruickhank, R. (1973). Microbiologia Médica. *Fundação calouste Gulbenkian*, 3<sup>a</sup>ed., Lisboa, 1128 pp.

Cupolillo E., Grimaldi G., Momen H., Beverly S.M. (1995) Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evaluation of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **73**, 145-155

Da-Cruz A.M., Conceição-Silva F., Berth A.L., Coutinho S.G. (1994) *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associate with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity* **62**, 2614-2618

Das G., Vohra H., Rao K., Saha B., Mishra G.C. (1999) *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4+ T cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. *Scandinavian Journal of Immunology* **49**, 307-310

Davies C.R., Cooper A.M., Peacock C., Lane R.P., Blackwell J.M. (1990) Expression of LPG and gp63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology* **101**, 337-343

Davies C.R., Kaye P., Croft S.L., and Sundar S. (2003) Leishmaniasis: new approaches to disease control. *British Medical Journal* **326**, 377-382

Deane L.M. (1956) Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. *Tese*. Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro, 162 pp.

De Beer P., El Harith A., Grootheest M., Winkler A. (1990) Outbreak of kala-azar in the Sudan. *The Lancet* **335**, 224

De Souza-Leão S.D., Lang T., Prina E., Hellio R., Antoine J-C. (1995) Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *Journal of Cell Science* **108**, 3219-3231

- Decker-Jackson J. E., Honigberg B. M. (1987) Glicoproteins released by *Leishmania donovani*: immunologic relationships with host and bacterial antigens and preliminary biochemical analysis. *Journal of protozoology*. **25**, 514-525
- Dedet J.P. (1990) cutaneous leishmaniasis in French Guiana: a review. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **43**, 25-28
- Dedet J.P. (1993) *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. *Annales de L'Institut Pasteur* **4**, 3-25
- Dedet J.P. (1994) Leishmanioses dans le Monde. *Médecine et Armées* **22**, 7-10
- Dedet J.P. (2000) Les leishmanioses: actualités. *La Presse Médicale* **29**, 1019-1026
- Delgado O., Guevara P., Silva S., Belfort E., Ramirez J.L. (1996) Follow-up of a human accidental infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* using conventional immunological techniques and polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **55**, 267-272
- Dereure J., Reynes J., Pratlong F., Lamaury I., Rioux J.A., Jambon F., Dedet J.P. (1995) Visceral leishmaniasis in HIV-infected patients in South of France. *Bulletin of the World Health Organization* **73**, 245-246
- Descoteaux A., Matlashewski G. (1989) *c-fos* and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Molecular and Cellular Biology* **9**, 5223-5227
- Descoteaux A., Turco S.J. (1993) the lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C. *Parasitology Today* **9**, 468-471
- Desjardins M., Descoteaux A. (1997) Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Parasitology* **185**, 2061-2068
- Desjeux P. (1996) Leishmaniasis - Public Health aspects and Control. *Clinics in Dermatology* **14**, 417-423
- Desjeux P. (1999) Aspects de santé publique et lutte. In: *Les leishmanioses*. Dedet JP (Ed.), Ellipses, Paris, 227-236

Dietze R., Barros G.B., Teixeira L., Harris J., Michelson K., Falqueto A., Corey R. (1997) Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clinical Infectious Diseases* **25**, 1240-1242

Dunan S., Toga I., Gambarelli F., Frank J., Lissouba M. (1987) L'apport des reactions immunologiques dans le diagnostic et la surveillance de l'évolution des leishmanioses humaine et canine. *Méditerranée Médical* **369**, 10-17

Durão J.F.C., Rebelo E., Peleteiro M.C., Correia J.J., Simões G. (1994) Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra). Nota preliminar. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* **89**, 140-144

El-On J., Bradley D. J., Freeman J. C. (1980) *Leishmania donovani*: action of excreted factor on hydrolytic enzyme activity of macrophages from mice with genetically different resistance to infection. *Experimental Parasitology*, **49**, 167-174.

El Tai N.O., El Fari M., Maurício I., Miles M.A., Oskam L., El Safi S.H., Presber W.H., Schonian G. (2001) *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based anlysis and DNA sequencing. *Experimental Parasitology* **97**, 35-44

Engvall E., Perlmann P. (1972) Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. III. Quantification of specific antibodies by enzyme labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *The Journal of Immunology* **109**, 129-135

Fong D., Chan M.M., Rodriguez R., Gatley L.J., Berman J.D., Grogl M. (1994) Paromomycin resistance in *Leishmania tropica*: lack of correlation with mutation in the small subunit ribosomal RNA gene. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **51**, 758-766.

França C. (1913) *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) et fièvre à Pappataci au Portugal. *Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique* **6**, 123-124

França C. (1919) Notes de Zoologie Médicale – Observations sur le genre *Phlebotomus*. *Brotéria (Série Zoológica)* **17**, 102-160

França-Silva J.C., da Costa R.T., Siqueira A.M., Machado-Coelho G.L., da Costa C.A., Mayrink W., Vieira E.P., Costa J.S., Genaro O., Nascimento E. (2003) Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology* **111**, 161-173

Franke E.D., McGreevy P.B., Katz S.P., Sacks D.L. (1985) Growth cycle dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. *Journal of Immunology* **134**, 2713-2718

Gardener P.J., Chance M.L., Peters W. (1974) Biochemical taxonomy of *Leishmania*. II. Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **68**, 317-325

Garnham P.C.C. (1965) The leishmanias, with special reference to the role of animal reservoirs. *American Zoologist* **5**, 141-151

Germain R.N., Malissen B. (1986) Analysis of the expression and function of class-II major Histocompatibility complex-encoded molecules by DNA-mediated gene transfer. *Annual Review of Immunology* **4**, 281-315

Germain R.N., Margulies D.H. (1993) the biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annual Review of Immunology* **11**, 403-450

Glew R.H., Saha A.K., Das S., Remaley A.T. (1988) Biochemistry of the *Leishmania* species. *Microbiology Reviews* **52**, 412-432

Gomes-Pereira S., Rodrigues O.R., Rolao N., Almeida P.D., Santos-Gomes G.M. (2004a) Hepatic cellular immune responses in mice with "cure" and "non-cure" phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8+ T cells and TGF-beta production. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **41**, 59-68

Gomes-Pereira S., Rodrigues O.R., Santos-Gomes G.M. (2004b) Dynamics of CD62L/CD45RB CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets in hepatic and splenic tissues during murine visceral leishmaniasis. *Immunological Letters* **95**, 63-70

Gorak P.M., Engwerda C.R., Kaye P.M. (1998) Dendritic cells, but not macrophages produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *European Journal of Immunology* **28**, 687-695

Gradoni, L. (1999) Epizootiology of canine Leishmaniasis in southern Europe. *In* Canine Leishmaniasis: an update. *Proceedings oh the International Canine Leishmaniasis Forum*, Barcelona, and Espanha: 32-39

Gradoni L., Gramiccia M., Mancianti F., Pieri S. (1988) Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **82**, 568-571

Gramiccia M., Gradoni L., di Martino L., Romano R., Ercolino D. (1992) Two syntopic zymodemes of *Leishmania infantum* cause human and canine visceral leishmaniasis in the Naples area, Italy. *Acta Tropica* **50**, 357-359

Green S.J., Meltzer M.S., Hibbs J.B., Nacy C.A. (1990) Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by a L-arginine dependent killing mechanism. *Journal of Immunology* **144**, 278-283

Grimm F., Jenni L. (1993) Human serum resistant promastigotes of *Leishmania infantum* in the midgut of *Phlebotomus perniciosus*. *Acta Tropica* **52**, 267-273

Grimm F., Brun R., Jenni L. (1991) Promastigote infectivity in *Leishmania infantum*. *Parasitology Research* **77**, 185-191

Ghosh A., Bandyopadhyay K., Kole L., Das P.K. (1999) Isolation of a laminin-binding protein from the protozoan parasite *Leishmania donovani* that may mediate cell adhesion. *Biochemical Journal* **337**, 551-558.

Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries J.E., Roncarolo M.G. (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742

Hall L.R., Titus R.G. (1995) Sandfly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *Journal of Immunology* **155**, 3501-3506

Handman E., Jarvis H.M., Mitchell G. M. (1984) *Leishmania major*, identification of stage-specific antigens and antigens shared by promastigotes and amastigotes. *Parasite Immunology*, **56**, 58-66.



Harith A.E., Kolk A.H.J., Kager P.A., Leeuwenburg J., Faber F.J., Muigai R., Kiuhu S., Laarman J.J. (1987) Evaluation of a newly development direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **81**, 603-606

Harith A.E., Kolk A.H.J., Kager P.A., Leeuwenburg J., Muigai R., Kiugu S., Laarman J.J. (1986) A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **80**, 583-587

Harith A.E., Slappendel R.J., Reiter I., Knapen F., Korte P., Huigan E., Kolk A.H.J. (1989) Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *The Journal of Clinical Microbiology* **27**, 2252-2257

Harrat Z., Pratlong F., Belazzoug S., Dereure J., Deniau M., Rioux J.A., Belkaid M., Dedet J.P. (1996) *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **90**, 625-629

Hatzigeorgiou D.E., Geng J., Zhu B., Zhang Y., Liu K., Rom W.N., Fenton M.J., Turco S.J., Ho J.L. (1996) Lipophosphoglycan from *Leishmania* suppresses agonist-induced interleukin-1 $\beta$  gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **93**, 14708-14713

Heinzel F.P., Sadick M.D., Holaday B.J., Coffman C.L., Locksley R.M. (1989) Reciprocal expression of interferon- $\gamma$  or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. *The Journal of Experimental Medicine* **169**, 59-72

Heinzel F.P., Sadick M.D., Mutha S.S., Locksley R.M. (1991) Production of interferon- $\gamma$ , interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **88**, 7011-7015

Heinzel F.P., Rerko R.M., Hatam F., Locksley R.M. (1993) IL-2 is necessary for the progression of leishmaniasis in susceptible murine hosts. *Journal of Immunology* **150**, 3924-31

Hermoso T., Fishelson Z., Becker S., Hirschberg K., Jaffe C.L. (1991) Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement cascade. *EMBO Journal* **10**, 4061-4067

- Higushi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* **10**, 413-417
- Hill J.O., Awwad M., North R.J. (1989) Elimination of CD4<sup>+</sup> suppressor T cells from susceptible BALB/C mice releases CD8<sup>+</sup> T lymphocytes to mediate protective immunity against *Leishmania*. *Journal of Experimental Medicine* **169**, 1819-1827.
- Hoare C.A. (1962) Reservoir hosts and natural foci of human protozoal infections. *Acta Tropica* **19**, 281-317
- Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **88**, 7276-7280
- Holzmuller P., Cavaleyra M., Moreaux J., Kovacic R., Vincendeau P., Papierok G., Lemesre J.L. (2005) Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **106**, 247-57
- Hommel M., Jaffe C., Travi B., Milon G. (1995) Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **89**, 55-73
- Hommel M., Peters W., Ranque J., Quillici M., Lanotte G. (1978) the micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **72**, 213-218
- Honoré S., Garin Y., Sulahian A., Gangneux J.P., Derouin F. (1998) Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **21**, 231-239
- Hoskens N.A., Shibuya K., Heath A.W., Murphy K.M., O'Garra A. (1995) The effect of antigen dose on CD4<sup>+</sup> T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *Journal of Experimental Medicine* **182**, 1579-1584
- Houin R., Jolivet G., Combescot C., Deniau M., Puel F., Barbier D., Romano P. (1977) Étude préliminaire d'un foyer de leishmaniose canine dans la région de Tours. *Colloques Internationaux du CNLS* **239**, 109-115

- Huang, F. P., D. Xu, E. O. Esfandiari, W. Sands, X. Q. Wei, and F. Y. Liew. (1998) Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. *Journal of Immunology* **160**, 4143-4147
- Hunter C.A., Suzuki Y., Subauste C.S., Remington J.S. (1996) Cells and cytokines in resistance to *Toxoplasma gondii*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **219**, 113-125
- Hubel, A., Krobitsch, S., Horauf, A., Clos, J., (1997) *Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Molecular Cellular of Biology*, **17**, 5987-5995
- Ilg T. (2000) Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. *EMBO Journal* **19**, 1953-1962
- Ilg T., Handman E., Stierhof Y.D. (1999) Proteophosphoglycans from *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Transactions of Biochemical Society* **27**, 518-525
- Ilg T., Stierhof Y. D., Etges R., Adrian M., Harbecke D., Overath P. (1991) Secreted acid phosphatase of *Leishmania mexicana*: a filamentous phosphoglycoprotein polymer. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, **88**, 8774-8778.
- Iniesta F.M., Iniesta E.M., Luyengo F.M. (1982) Papel de perros y zorros como reservatorios de leishmanioses en la region Murciana. Resultados preliminares. *Revista Ibérica de Parasitologia* **42**, 307-313
- Jaffe C.L. (1999) Recent trends in vaccine development and immunization. *Clinical Dermatology* **17**, 339-344
- Jiménez M.L., Gutiérrez-Solar B., Benito A., Aguiar A., Garcia E., Cercenado E., Alvar J. (1991) Cutaneous *Leishmania (L.) infantum* zymodemes isolated from bone marrow in AIDS patients. *Research and Reviews in Parasitology* **51**, 95-99
- Jones G.E. (2000) Cellular signalling in macrophage migration and chemotaxis. *Journal of Leukocyte Biology* **68**, 593-602

- Joshi P.B., Sacks D.L., Modi G., McMaster W.R. (1998) Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (gp63). *Molecular Microbiology* **27**, 519-530
- Julia V., Rassoulazadegan M., Glaichenhaus N. (1996) Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science* **274**, 421-423
- Kantengwa, S., Muller, L., Louis, J., Polla, B.S., (1995) Infection of human and murine macrophages with *Leishmania major* is associated with early parasite heat shock protein synthesis but fails to induce a host cell stress response. *Immunology and Cellular Biology*, **73**, 73-80
- Kagan I.G. (1979) Diagnostic epidemiologic and experimental parasitology: immunologic aspects. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **28**, 429-439
- Kamhawi S., Belkaid Y., Modi G., Rowton E., Sacks D. (2000) Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* **290**, 1351-1354
- Kane M.M., Mosser D.M. (2001) The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. *The Journal of Immunology* **166**, 1141-1147
- Kaneshiro E. S., Gottlieb M., Dwyer D. M. (1982) Cell surface origin of antigens shed by *Leishmania donovani* during growth in axenic culture. *Infection and Immunity*, **37**, 393-394.
- Katakura K., Kawazu S.I., Sanjyoba C., Naya T., Matsumoto Y., Ito M., Nagakura K., Aikawa M., Hashiguchi Y. (1998) *Leishmania* mini-exon genes for molecular epidemiology of leishmaniasis in China and Ecuador. *Tokai Journal of Experimental Clinical Medicine* **23**, 393-399
- Kaye P.M., Bancroft G.J. (1992) *Leishmania donovani* infection in scid mice: lack of tissue response and *in vivo* macrophage activation correlates with failure to trigger natural killer cell-derived gamma interferon production *in vitro*. *Infection and Immunity* **60**, 4335-4342
- Kaye P.M., Curry A.J., Blackwell J.M. (1991) Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology* **146**, 2763-2770

Kemp M. (1997) Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections. *APMIS Suppl.* 1997 **68**, 1-33

Killick-Kendrick R. (1990) the life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **65** (Sup.1), 37-42

Killick-Kendrick R. (2002) Phlebotomine sand flies: biology and control. In: *Leishmania. World Class Parasites: volume 4*. Farrell J.P. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, London, 193 pp.

Killick-Kendrick R., Killick-Kendrick M. (1997) A new tool for the control of canine leishmaniasis: deltamethrin dog collars for longterm protection from sandflies bites. *Acta Parasitologica Turcica* **21** (supl.1), 159

Killick-Kendrick R., Killick-Kendrick M., Focheux C., Dereure J., Puech M.P., Cadiergues M.C. (1997) Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for the control of canine leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology* **11**, 105-111

Killick-Kendrick R., Killick-Kendrick M., Pinelli E., Del Real G., Molina R., Vitutia M.M., Canavate M.C., Nieto J. (1994) A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite* **1**, 311-318

Killick-Kendrick R., Leaney A.J., Ready P.D., Molyneux D.H. (1997) *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the Royal Society London Biological Sciences* **196**, 105-115

Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A. (1991) *Leishmania*: Cycle intravectoriel. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **6**, 71-74

Killick-Kendrick R., Wallbanks K.R., Molyneux D.H., Lavin D.R. (1988) The ultrastructure of *Leishmania major* in the foregut and proboscis of *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology Research* **74**, 586-590

Killick-Kendrick R., Ward R. (1981) Ecology of *Leishmania*. *Parasitology* **82**, 143-152

Kima P.E., Soong L., Chicharro C., Ruddle N.H., McMahon-Pratt D. (1996) *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells. *European Journal of Immunology* **26**, 3163-3169

King D. L., Chang Y. D., Turco S. J. (1987) Cell surface lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **24**, 47-53.

Koehler K., Stechele M., Hetzel U., Domingo M., Schonian G., Zahner H., Burkhardt E. (2002) Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology* **109**, 9

Konecny P., Stagg A.J., Jebbari H., English N., Davidson R.N., Knight S.C. (1999) Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation *in vitro*. *European Journal of Immunology* **29**, 1803-1811

Kopf M., Brombacher F., Kohler G., Kienzel G., Widmann K.H., Lefrang K., Humborg C., Ledermann B., Solbach W. (1996) IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *L. major*. *Journal of Experimental Medicine* **184**, 1127-1136

Kwan W.C., McMaster R., Wong N., Reiner N.E. (1992) Inhibition of expression of Major Histocompatibility complex class II molecules in macrophages infected with *Leishmania donovani* occurs at the level of gene transcription via a cyclic AMP-independent mechanism. *Infection and Immunity* **60**, 2115-2120

Kweider M., Lemersre J.P., Darcy F., Kurnierz J.P., Capron A., Santoro F. (1987) Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65 kDa surface antigen. *Journal of Immunology* **138**, 299-305

Lainson, R., Shaw, J.J. (1977) Leishmaniasis in Brasil. XII. Observations on cross immunity in monkeys and man infected *Leishmania mexicana mexicana*, *L. m. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. b. guyanensis* e *L. b. panamensis*. *Jornal of Tropical Medicine and Hygiene*, **80**, 29-35

Lainson R., Shaw J.J. (1987) Evolution, classification and geographical distribution. In: *The leishmaniasis in biology and medicine*. Peters W., Killick-Kendrick R. (Eds.), Academic Press, London **1**, 1-20

Laskay T., Diefenbach A., Rollinghoff M., Solbach W. (1995) Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *European Journal of Immunology* **25**, 2220-2227

Latyshev N.I., Shoshina M.A., Polyakov A.J. (1951) Essays on the regional Parasitology of Middle Asia. II. Visceral and cutaneous leishmaniasis in the Town Osh (Kirgisia). *Problems of Regional, General and Experimental Parasitology Medical Zoology, Moscow* **7**, 63-69

Launois P., Maillard I., Pingel S., Swihart K.J., Xenarios I., Achaorbea H., Diggelmann H., Locksley R.M., MacDonald H.R., Louis J.A. (1997) IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* **6**, 541-549

Lawyer P.J., Ngumbi P.M., Anjili C.O., Odongo S.O., Mebrahtu Y.B., Githure J.I., Koech D.K., Roberts C.R. (1990) Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqui* and *Sergentomyia schwetzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **43**, 31-43

Leandro C., Santos-Gomes G.M., Campino L., Romao P., Cortes S., Rolao N., Gomes-Pereira S., Rica Capela M.J., Abranches P. (2001) Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **79**, 273-84

Lehmann J., Enssle K-H., Lehmann I., Emmendorfer A., Lohmann-Matthes M-L. (2000) The capacity to produce IFN- $\gamma$  rather than the presence of interleukin-4 determines the resistance and the degree of susceptibility to *Leishmania donovani* infection in mice. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **20**, 63-77

Liew F.Y., Millott S., Parkinson C., Palmer R.M., Moncada S. (1990) Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of Immunology* **144**, 4794-4797

Lima H., Titus R.G. (1996) Effects of sandfly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and Immunity* **64**, 5442-5445

Locksley R.M., Reiner S.L., Hatam F., Littman D.R., Killeen N. (1993) Helper T cells without CD4: control of leishmaniasis in CD4-deficient mice. *Science* **261**, 1448-1451

Locksley R.M., Heinzel F.P., Sadick M.D., and Holaday B.J., Gardner K.D. (1987) Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Annals of the Institut Pasteur Immunology* **138**, 744-749

Londner M. V., Frankenburg S., Slutzky G. M., Greenblatt C. L. (1983) Action of leishmanial excreted factor (EF) on human lymphocyte blast transformation. *Parasite Immunology*, **5**, 249-256.

Lubova. (1973) In: Kellina, O.I. 1981. Problem and current lines in investigations on the epidemiology of leishmaniasis and its control in the URSS. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* **74**, 306-318

L  der G.K., Gross U., Lopes M.F. (2001) Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends in Parasitology* **17**, 480-486

Ma X., Neurath M., Gri G., Trinchieri G. (1996) The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *Journal of Experimental Medicine* **18**, 147-157

Maarouf M., Lawrence F., Brown S., Robert-Gero M., (1997) Biochemical alterations in paromomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasitology Research* **83**, 198-202

Maio J.F.V., Lopes A.M., Soares I.M.A.M., Nereu V.H.C.C. (1986) Kala-azar. Análise casu  stica do Serviço de Pediatria do Hospital Distrital de Faro. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* **9**, 177-180

Mancianti F., Gramiccia M., Gradoni L., Pieri S. (1988) Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **82**, 566-567

Manso J., Dias F., Neto E. (1998) Leishman  ase cut  nea localizada. *Acta Pedi  trica Portuguesa* **29**, 21-24

Mansueto S., Di Leo R., Miceli M.D., Quartararo P. (1982) Canine leishmaniasis in three foci in Western Sicily. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **76**, 565-566

Marselha R., de Gopegui R.R. (1998) Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. *International Journal of Dermatology* **37**, 801-814



- Martínez P., Vega E., Laguna F., Soriano V., Puente S., Moreno V., Senthordi M.J., García-Aguado C., González-Lahoz J. (1993) Diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-infected individuals using peripheral blood smears. *AIDS* **7**, 227-230
- Martinez-Ortega E., Conesa-Gallego C.E., Macfarlane D., Ward R.D. (1983) Ectoparasitic mites on phlebotomines sandflies (Diptera, Psychodidae) from Spain. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **77**, 545-546
- Marty P., Levièvre A., Quaranta J.F., Suffia I., Eulalio M., Gari-Toussaint M., Le Fichoux Y., Kubar J. (1995) Detection by Western blot of four antigens characterizing acute clinical leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **89**, 690-691
- Marty P.O., Pratlong F., Marcelet B., Adda A., Le Fichoux Y. (1994) *Leishmania infantum* variant MON- 24 isolé d'une lésion cutanée dans la banlieu de Nice (France). *Parasite* **1**, 175-176
- Mary C., Lamouroux D., Dunan S., Quillici M. (1992) Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14 kDa and 16 kDa antigens for diagnosis and epidemiological purposes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **47**, 764-771
- Mattner F., Di Padova K., Alber G. (1997) Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. *Infection and Immunity* **65**, 4378-83
- Maurício I.L., Campino L., Abranches P. (1995) Controlo de qualidade da técnica de micro-ELISA aplicada ao diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina. *Acta Médica Portuguesa* **8**, 607-611
- Maurício I.L., Howard M.K., Stothard J.R., Miles M.A. (1999) Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* **119**, 237-246
- Mayrink W., Genaro O., Silva J.C., da Costa R.T., Tafuri W.L., Toledo V.P., da Silva A.R., Reis A.B., Williams P., da Costa P.W. (1996) Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **91**, 695-697
- Mazumdar T, Anam K, Ali N. (2004) A mixed Th1/Th2 response elicited by a liposomal formulation of *Leishmania* vaccine instructs Th1 responses and resistance to *Leishmania donovani* in susceptible BALB/c mice. *Vaccine* **22**, 1162-1171

McConville M.J., Ferguson M.A. (1993) The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Journal of Biochemistry* **294**, 305-324

McGregor A. (1998) WHO warns of epidemic *Leishmania*. *The Lancet* **351**, 575

McGwire B.S., O'Connell W.A., Chang K.P., Engman D.M., (2002) Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 8802-8809

McGwire B.S., Chang K.P., Engman D.M., (2003) Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infection and Immunity* **71**, 1008-1010.

Medrano F.J., Jiménez-Mejías E., Calderón E., Regordan C., Leal M. (1993) An easy and quick method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-1-infected individuals. *AIDS* **7**, 1399

Melby P.C. (1991) Experimental leishmaniasis in humans: review. *Reviews Infectious Diseases* **13**, 1009-1017

Melo H., Gil J., Valente A. (1996) Leishmaníase cutânea. Casos clínicos Hospital Amato Lusitano-Castelo Branco. *Revista de Saúde Amato Lusitano* **1**, 15-17

Meredith S., Zijlstra E., Schoone G. (1993) Development and application of the polymerase chain reaction for the detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis* **70**, 419-431

Millesimo M., Zucca M., Caramello P., Savoia D. (1996) Evaluation of the immune response in visceral leishmaniasis. *Diagnosis of Microbiological Infectious Diseases* **26**, 7-11

Modabber F. (1989) Experiences with vaccines against cutaneous leishmaniasis: of men and mice. *Parasitology* **98** Suppl S49-60

Molina R., Amela C., Nieto J., San-Andrés M., González F., Castillo J.A., Lucientes J., Alvar J. (1994) Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonised *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **88**, 491-493

- Molina R., Lohse J.M., Pulido F., Laguna F., Lopez-Velez R., Alvar J. (1999) Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **60**, 51-3.
- Moll H., Flohe S., Rollinghoff M. (1995) Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbour persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *European Journal of Immunology* **25**, 693-699
- Molyneux D., Killick-Kendrick R. (1987) Morphology ultrastructure and life cycles. In: "The leishmaniasis in biology and medicine". Peters W., Killick-Kendrick R. (Ed.), Academic Press, London, 941 pp.
- Momen H., Grimaldi G.Jr, Silva A.R., Miranda M.G.R., Cibulskis R. (1987) A multilocus enzyme study showing phenotypic similarity between *L. d. chagasi* and *L. infantum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **82**, sup1, 87
- Moore K.J., Matlashewski G. (1994) Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *Journal of Immunology* **152**, 2930-2937
- Morales M.A., Chicharro C., Ares M., Canavete C., Barker D.C., Alvar J. (2001) Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene* **95**, 104-107
- Moreno G., Rioux J.A., Lanotte G., Pratlong F., Serres E. (1986) Le complexe *Leishmania donovani* sl. Analyse enzymatique du complexe *Leishmania infantum*. Corollaires biogéographiques et phylétiques. À propos de 146 souches originaires de l'Ancien et du Nouveau Monde. In: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. Rioux J.A. (Ed.), IMEEE, Montpellier, 105-117
- Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* **136**, 2348-2357
- Mosmann T.R., Coffman R.L. (1989) Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology* **7**, 145-173

Mosser D.M., Edelson P.J. (1984) Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *Journal of Immunology* **132**, 1501-1505

Mosser D.M., Rosenthal L.A. (1993) *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands, and diverse cellular responses. *Seminars in Cell Biology* **4**, 315-325

Mougneau E., Altare F., Wakil A.E., Zheng S., Coppola T., Wang Z.E., Waldmann R., Locksley R.M., Glaichenhaus N. (1995) Expression and cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science* **268**, 563-566

Mukherjee P., Ghosh A.K., Ghose A.C. (2003) Infection pattern and immune response in the spleen and liver of BALB/c mice intracardially infected with *Leishmania donovani* amastigotes. *Immunology Letters* **86**, 131-8.

Mukerji K., Das A. K., Banerjee N., Ghosh D. K. (1986) Studies on exoantigens of *Leishmania donovani*. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, **23**, 148-151.

Mukhopadhyay A.K., Hati A.K., Chakraborty S., Saxena N.B. (1996) Effect of DDT on *Phlebotomus* sandflies in kala-azar endemic foci in West Bengal. *Journal of Communicable Diseases* **28**, 171-175

Muller I., Pedrazzini T., Kropf P., Louis J., Milon G. (1991) Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/C mice requires parasite-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Internacional Immunology* **3**, 587-597

Muller I., Kropf P., Etges R.J., Louis J.A. (1993) Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role for CD8<sup>+</sup> T cells. *Infection and Immunity* **61**, 3730-3738

Murray H.W. (1997) Endogenous IL-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* **175**, 1477-1479

Murray H.W. (2000) Mononuclear cell recruitment, granuloma assembly, and response to treatment in experimental visceral leishmaniasis: intracellular adhesion molecule 1-dependent and -independent regulation. *Infection and Immunity* **68**, 6294-6299

- Murray H.W., Hariprashad J. (1995a) Interleukin 12 is effective treatment for an established systemic intracellular infection: experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine* **181**, 387-391
- Murray H.W., Hariprashad J., Agüero B., Arakawa T., Yeganegi H. (1995b) Intracellular antimicrobial response of a T-cell deficient host to cytokine therapy: effect of interferon-gamma in experimental visceral leishmaniasis in nude mice. *Journal of Infectious Diseases* **171**, 1309-1316
- Murray H.W., Squires K.E., Miralles C.D., Stoeckle M.Y., Granger A.M., Granelli-Piperno A., Bogdan C. (1992) Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology* **148**, 1858-1863
- Murray P.J., Handman E., Glaser T.A., Spithili T.W. (1990) *Leishmania major*: expression and gene structure of glycoprotein 63 molecule in virulent and avirulent clones and strains. *Experimental Parasitology* **71**, 294-304
- Nandan D., Reiner N.E. (1995) Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signalling through Janus kinases and Stat1. *Infection and Immunity* **63**, 4495-4500
- Nathan-Larrier L., Grimard-Richard L. (1933) Une méthode de diagnostic de la Leishmaniose viscérale. *Comptes Rendus de la Société de Biologie*, **113**, 1489-1492
- Neogy A.B., Vouldoukis I., da Costa J.M., Monjour L. (1994) Exploitation of parasite-derived antigen in therapeutic success against canine visceral leishmaniosis. Veterinary Group of Lupino. *Veterinary Parasitology* **54**, 367-373
- Nieto J., Cañavate M., De Fuentes I., Rodríguez E., Aguiar A., García E., Del Real G. (1991) Enayo de la vacunacion frente a leishmaniosis canina. Analisis de la respuesta a antigenos purificados. Parasitologia en Sur-Oeste de Europa. I Congreso Internacional de las Asociaciones Suoccidental-Europeas de Parasitologia ICASEP I, 186
- Noben-Trauth N., Kropf P., Müller I. (1996) Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science* **271**, 987-990

- Nuzum E., White F., Thakur C., Dietze R., Wages J., Gogl M., Berman J. (1995) Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by the use of the polymerase chain reaction on patient blood. *The Journal of Infectious Diseases* **171**, 751-754
- Nylen S., Maasho K., McMahon-Pratt D., Akuffo H. (2004) Leishmanial amastigote antigen P-2 induces major histocompatibility complex class II-dependent natural killer-cell reactivity in cells from healthy donors. *Scandinavian Journal of Immunology* **59**, 294-304
- Oddo F.G., Cascio B. (1963) IL test di Immuno-fluorescenza nele leishmaniosi viscerale e cutanea. *Rivista dell'Istituto Sieroterapico Italiano* **38**, 139-145
- O'Garra A., Arai N. (2000) The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in Cell Biology* **10**, 542-550
- Oliveira M.A., Tadokoro C.E., Lima G.M., Mosca T., Vieira L.Q., Leenen P.J., Abrahamsohn I.A. (2005) Macrophages at intermediate stage of maturation produce high levels of IL-12 p40 upon stimulation with *Leishmania*. *Microbes and Infection* **7**, 213-223
- Olivier M., Brownsey R.W., Reiner N.E. (1992) Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **89**, 7481-7485
- Olliaro P.L., Bryceson A.D. (1993) Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitology Today* **9**, 323-328
- Osman O.F., Oskam L., Zijlstra E.E., El-Hassan A.M., El-Naeim D.A., Kager P.A. (1998) Use of the polymerase chain reaction to assess the success of visceral leishmaniasis treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **92**, 397-400
- Oswald I.P., Gazzinelli R.T., Sher A., James S.L. (1992) IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *Journal of Immunology* **148**, 3578-82
- Palatnik-de-Sousa C.B., dos Santos W.R., França-Silva J.C., da Costa R.T., Reis A.B., Palatnik M., Mayrink W., Genaro O. (2001) Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **65**, 510-517

Park A.Y, Hondowicz B., Kopf M., Scott P. (2002) The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. *Journal of Immunology* **168**, 5771-5777

Pearson R.D., Sousa Q. (1996) Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* **22**, 1-13

Pearson R.D., Steigbigel R.T. (1980) Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *Journal of Immunology* **125**, 2195-2201

Pearson R.D., Steigbigel R.T. (1981) Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Immunology* **127**, 1438-1443

Pener H., Wilamowski A. (1996) Susceptibility of larvae of the sandfly *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae) to *Bacillus sphaericus*. *Bulletin of Entomological Research* **86**, 173-175

Pennisi M.G., Masucci M., Catarsini O. (1998) Presenza di anticorpi anti-*Leishmania* in FIV gatti che vivono in zona endemica. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie* **52**, 265-266

Petrisceva P.A. (1961) Methods of study and the prophylaxis of the leishmaniasis and sandfly fever. *Medgiz, Moscow* (In: Dedet, 1976)

Pimenta P.F., Modi G.B., Pereira S.T., Shahabuddin M., Sacks D.L. (1997) A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. *Parasitology* **115**, 359-369

Pimenta P.F., Saraiva E.M., Rowton E., Modi G.B., Garraway L.A., Beverley S.M., Turco S.J., Sacks D.L. (1994) Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sandflies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **91**, 9155-9156

Pinelli E., Killick-Kendrick R., Wagenaar J., Bernadina W., del Real G., Ruitenbergh J. (1994) Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity* **62**, 229-235

- Pinelli E., Gonzalo R.M., Boog C.J., Rutten V.P., Gebhard D., del Real G., Ruitenbergh J. (1995) *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *European Journal of Immunology* **25**, 1594-1600
- Pinelli E., Rutten V.P.M.G., Bruysters M., Moore P.F., Ruitenbergh E.J. (1999) Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T cell proliferation and gamma interferon production. *Infection and Immunity* **67**, 237-243
- Pingel S., Launois P., Fowell D.J., Turck C.W., Southwood S., Sette A., Glaichenhaus N., Louis J.A., Locksley R.M. (1999) Altered ligands reveal limited plasticity in the T cell response to a pathogenic epitope. *Journal of Experimental Medicine* **189**, 1111-1120
- Pires C.A. (1979) Contribuição para o conhecimento da distribuição e bioecologia dos flebótomos em Portugal (Díptera, Psychodidae). *Boletim da Sociedade Portuguesa de Ciências Naturais* **19**, 197-210
- Pires C.A. (1984) Les phlébotomes du Portugal. I- Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, par *Leishmania* dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **59**, 521-524
- Pires C.A., Riça Capela M.J., Aguiar P. (1997a) Acção repelente de um piretróide – Dowing spray em *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911. *Acta Parasitológica Portuguesa* **4**, 203
- Pires C.A., Santos-Gomes G.M., Pratlong F., Ribeiro H., Campino L., Abranches P. (1991) Les phlébotomes du Portugal. IV- Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* par *Leishmania infantum* MON-24 dans le foyer de l'Alto Douro. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **66**, 47-48
- Pires C.A., Tang Y., Killick-Kendrick R. (1997b) *Didilia* sp. (Tetradonematidae: Mermithoidea: Nematoda) a parasite of *Phlebotomus sergenti* in Portugal. *Parasite* **2**, 191-192
- Pozio E., Gradoni L., Bettini S., Gramiccia M. (1981) Leishmaniasis in Tuscany (Italy). V. Further isolation of *Leishmania* from *Rattus rattus* in the province of Grosseto. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **75**, 393-395



- Pratlong F., Dedet J.P., Marty P., Portús M., Deniau M., Dereure J., Abranches P., Reynes J., Martini A., Lefebvre M., Rioux J.A. (1995) *Leishmania*-Humaine immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin: Isoenzymatic characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *The Journal of Infectious Diseases* **172**, 323-326
- Proudfoot L., Nikolaev A.V., Feng G-J., Wei W.Q., Ferguson M.A., Brimacombe J.S., Liew F.Y. (1996) Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **93**, 10984-10989
- Proudfoot L., O'Donnell C.A., Liew F.Y. (1995) Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibits nitric oxide synthesis and reduces leishmanicidal activity in murine macrophages. *European Journal of Immunology* **25**, 745-750
- Puentes S.M., Sacks D.L., da Silva R.P., Joiner K.A. (1988) Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of surface lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine* **167**, 887-902
- Puentes S.M., da Dilva R.P., Sacks D.L., Hammer C.H., Joiner K.A. (1990) Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-C9. *Journal of Immunology* **145**, 4311-4316
- Quilici M., Dunan S., Dumon H., Franck J., Gambarelli F., Toga I. (1987) La leishmaniose visceral humaine en Provence. Considérations d'actualité. *Médical Chirurgical* **16**, 511-514
- Quinnell R.J., Courtney O., Shaw M.A., Day M.A., Garcez L.M., Dye C., Kaye P.M. (2001) Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* **183**, 1421-1424
- Ramos A., Farinhote A.A.C. (1952) Contribuição para o conhecimento do kala-azar em Portugal. *Anais do Instituto de Medicina Tropical* **2**, 1485-1500
- Ramos A., Maslov D.A., Fernandes O., Campbell D.A., Simpson L. (1996) Detection and identification of human pathogenic *Leishmania* and *Trypanosoma* species by hybridization of PCR-amplified minixon repeats. *Experimental Parasitology* **82**, 242-250

Ramamoorthy, R., Donelson, J.E., Paetz, K.E., Maybodi, M., Roberts, S.C., Wilson, M.E., (1992) Three distinct RNAs for the surface proteasegp63 are differentially expressed during development of *Leishmania dovani chagasi* promastigotes to an infectious form. *The journal of Biological Chemistry*, **267**, 1888-1895

Raqib R., Ljungdahl A., Lindberg A.A., Wretling B., Andersson U., Andersson J. (1996) Dissociation between cytokine mRNA expression and protein production in shigellosis. *European Journal of Immunology* **26**, 1130-1138

Ray M., Gam A., Boykins R., Kenney R. (2000) Inhibition of interferon-gamma signalling by *Leishmania donovani*. *Journal of Infectious Diseases* **181**, 1121-1128

Reed S.G., Scott P. (1993) T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Current Opinion in Immunology* **5**, 524-531

Reiner N.E. (1987) Parasite accessory cell interactions in murine leishmaniasis. I. Evasion and stimulusdependent suppression of the macrophage interleukin-1 response by *Leishmania donovani*. *Journal of Immunology* **138**, 1919-1925

Reiner N.E., Winnie N.G., McMaster W. (1987) Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *Journal of Immunology* **138**, 1926-1932

Reiner S.L.O., Zheng S., Wang Z-E., Stowring L., Locksley R.M. (1994) *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *Journal of Experimental Medicine* **179**, 447-456

Reithinger R., Quinnell R.J., Alexander B., Davies C.R. (2002) Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 2352-2356

Rey L. (1972) *Parasitologia*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 695 pp.

Richardson U.F. (1926) A probable case of equine leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **19**, 411

- Riça Capela M.J., Cortes S., Leandro C., Peleteiro C., Santos-Gomes G.M., Campino L. (2003) Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *L. infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitology Research* **89**, 163-169
- Rioux J.A., Albaret J.L., Houin R., Dedet J.P., Lanotte G. (1968) Écologie des leishmanioses dans Le Sud de France. 2. Les reservoirs selvatiques. Infestation spontanée du renard (*Vulpes vulpes* L.). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **43**, 421-428
- Rioux J.A., Lanotte G., Serres E., Pratlong F., Bastien P., Périeres J. (1990) Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **65**, 111-125
- Rittig M.G., Burmester G.R., Krause A. (1998) Coiling phagocytosis of trypanosomatids and fungal cells. *Infection and Immunity* **66**, 4331-4339
- Rittig M.G., Bogdan C. (2000) *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitology Today* **16**, 292-297
- Roitt, L., Brostoff, J., Male, D. (1996) Immunology, 4<sup>th</sup> ed. Mosby, London, 18.10-18.19
- Rolland L., Zilberfarb V., Furtado A., Gentillini M. (1994) Identification of a 94 kilodalton antigen on *Leishmania* promastigote forms and its specific recognition in human and canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology* **16**, 599-609
- Rosenthal E., Marty P., Poizot-Martin I., Reynes J., Pratlong F., Lafeuillade A., Jaubert D., Boulat O., Dereure J., Gambarelli F., Gastaut J-A., Dujardin P., Dellamonic P., Cassuto J-P. (1995) visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in Southern France. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **89**, 159-162
- Rosenthal L.A., Sutterwala F.S., Kehrli M.E., Mosser D.M. (1996) *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infection and Immunity* **64**, 2206-2215
- Rousseau D., Demartino S., Ferrua B., Michiels J.F., Anjuère F., Fragaki K., Le Fichoux Y., Kubar J. (2001b) *In vivo* involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. *BMC Microbiology* **1**, 17-21

Russel D.G. (1987) The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. *European Journal of Biochemistry* **164**, 213-221

Russell D.G., Wilhelm H. (1986) The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *Journal of Immunology* **136**, 2613-2620

Russo D.M., Armitage R.J., Barral-Netto M., Barral A., Grabstein K.H., Reed S.G. (1993) Antigen-reactive gamma delta T cells in human leishmaniasis. *Journal of Immunology* **151**, 3712-3718

Sacerdoti-Sierra N., Siman-Tov N.M., Aspira M., Jaffe C.L. (1997) Leishmanial protein kinases and parasite survival. Abstr. 1. *Acta Parasitologica Turca* **21**, 3

Sacks, D.L., Brodin, T.N., Turco, S.J. (1990) Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. *Molecular Biochemical and Parasitology*, **42**, 225-233

Sacks D.L., Perkins, P. (1984) Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, **223**, 1417-1419

Sacks D.L., Pimenta M.J., McConville M.J., Schneider P., and Turco S.J. (1995) Stage specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine* **181**, 685-697

Sadick M.D., Locksley R.M., and Tubbs C., Ralff H.V. (1986) Murine cutaneous leishmaniasis: resistance correlates with the capacity to generate interferon- $\gamma$  in response to *Leishmania* antigens *in vitro*. *Journal of Immunology* **136**, 655-661

Sampaio-Silva M.L., Campino L., Avelino I., Santos-Gomes G.M., Seixas-Lopes A. (1993) Kala-azar em Portugal. VIII. Estudo epidemiológico da leishmaniose canina em três concelhos do Alto Douro. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* **16**, 241-244

Sanchez J., Marquez F., Sanchez C. (1995) the variability of the etiological agent of leishmaniasis in the north-east of the Almeria Region, south-east Spain. *Systematic Parasitology* **30**, 233-238

Santos-Gomes, G.M. (1995) Caracterização biológica de *Leishmania infantum*. Estudos da virulência e patogenia da infecção de estirpes isoladas em Portugal. *Tese*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 163 pp.

Santos-Gomes G.M., Abranches P. (1996) Comparative study of infectivity caused by promastigotes of *Leishmania infantum* MON-1, *L. infantum* MON-24 and *L. donovani* MON-18. *Folia Parasitologica* **43**, 7-12

Santos-Gomes G., Campino L., Gomes-Pereira S., Pires R., Abranches P. (1998) Leishmaniasis in Portugal: epidemiological situation and evaluation of diagnostic methods. *Giornale Italiano di Medicina Tropicale* **3**, 89-94

Santos-Gomes G.M., Campino L., Abranches P. (2000a) Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **95**, 193-198

Santos-Gomes G.M., Gomes-Pereira S., Campino L., Almeida-Araújo M., Abranches P. (2000b) Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-*Leishmania* sp.-coinfected patients. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 175-178

Santos-Gomes G.M., Rosa R., Leandro C., Cortes S., Romao P., Silveira H. (2002) Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **88**, 21-30.

Schlein Y. (1993) *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitology Today* **7**, 255-258

Schlein Y., Jacobson R.L., Shlomai J. (1991) Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proceedings of the Royal Society London Biological Sciences* **245**, 121-126

Schrey C.F., Pires C.A., Macvane D.W. (1989) Distribution of phlebotomine sandflies and the rate of their infection with *Leishmania* promastigotes in the Algarve, Portugal. *Medical and Veterinary Entomology* **3**, 125-130

Scott P. (2003) Development and regulation of cell-mediated immunity in experimental leishmaniasis. *Immunologic Research* **27**, 489-498

- Scott P. (1991) IFN- $\gamma$  modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Immunology* **147**, 3149-3155
- Seay M.B., Heard P.L., Chaudhuri G. (1996) Surface Zn-proteinase as a molecule of defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infection and Immunity* **64**, 5129-5137
- Sedlik C. (1996) Les sous-populations de lymphocytes Th1 et Th2: caractérisation, rôle physiologique et régulation. *Bulletin Institute Pasteur* **94**, 173-200
- Semião-Santos S.J., Harith A.E., Ferreira E., Pires C.A., Sousa C., Gusmão R. (1995) Évora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitology Research* **81**, 235-239
- Sereno D., Guilvard E., Maquaire S., Cavaleyra M., Holzmüller P., Ouassii A., Lemesre J.L. (2001) Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the in vitro life cycle of *Leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas. *Acta Tropica* **80**, 195-205
- Sergeiev V. P., Shuikina E. V. (1969) Soluble antigen in *Leishmania tropica major*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **38**, 208-212.
- Sergent Ed., Sergent Et., Lombard, Quilichini (1912) La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* **5**, 93-98
- Shreffler, W.G., Burns, J.M.Jr., Badaró, R., Ghalib, H.M., Button, L.L., McMaster, W.R., Reed, S.G. (1993) Antibody responses of visceral Leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species. *The Journal of Infectious Diseases*, **167**, 426-430
- Singh R., Das R.P., Sharma S.K. (2001) Resistance of sandflies to DDT in kala-azar endemic districts of Bihar, India. *Bulletin of World Health Organization* **79**, 793
- Skeiky Y.A., Guderin J.A., Benson D.R., Bacelar O., Carvalho E.M., Kubin M., Badaro R., Trinchieri G., Reed S.G. (1995) A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *Journal of Experimental Medicine* **181**, 1527-1537

- Smith A.J., Ghosh A., Hassan M.Q., Basu D., Bruijn M.H.L., Adhya S., Mallik K.K., Barker D.C. (1992) Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology* **105**, 183-192
- Smith, L. E., M. Rodrigues, and D. G. Russell. (1991) The interaction between CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells and *Leishmania*-infected macrophages. *Journal of Experimental Medicine* **174**, 499-505
- Sorensen A.L, Hey A.S., Kharazmi A. (1994) *Leishmania major* surface protease gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils *in vitro*. *Acta Pathological Microbiological Immunological Scandinave* **102**, 265-271
- Späth G.F., Epstein L., Leader B., Singer S.M., Avila H.A., Turco S.J., Beverley S.M. (2000) Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **97**, 9258-9263
- Stenger S., Thüring H., Rölinghoff M., Bogdan C. (1994) Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *Journal of Experimental Medicine* **180**, 783-793
- Stern J.J., Oca M.J., Rubin B.Y., Anderson S.L., Murray H.W. (1988) Role of L3T4<sup>+</sup> and Lyt 2<sup>+</sup> cells in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology* **140**, 3971-3977
- Steuber S., Moritz A., Schirrmann I., Greiner M., (1999) PCR follow-up examination after treatment of canine leishmaniosis (CaL). *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine* **23**, 285-292.
- Stierhof Y.D., Bates P.A., Jacobson R.L., Rogers M.E., Schlein Y., Handman E., Igl T. (1999) Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like threedimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *European Journal Cell Biology* **78**, 675-689
- Storkus W.J., Tahara H., Lotze M.T. (1998) Interleukin-12. *In: The Cytokine Handbook*. Thirrd ed. Thomson A. (Ed.) WBC Book Manufactures, Bridgend, Mid Glamorgan, UK, 1017 pp.
- Svobodová, M., Volf, P., Killick-Kendrick, R. (1996). Agglutination of *Leishmania* promastigotes by midgut lectins from various species of phlebotomine sandflies. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **90**, 329-336

- Sundar, S. (2001) Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health* **6**, 849-854
- Sypek J.P., Chung C.L., Mayor S.E., Subramanyam J.M., Goldman S.J., Sieburth D.S., Wolf S.F., Schaub R.G. (1993) Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *Journal of Experimental Medicine* **177**, 1797-802
- Tesh R. (1995) Control of zoonotic visceral leishmaniasis: Is it time to change strategies? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **52**, 287-292
- Tetreault G.E., Zayed A.E., Hanafi H.A., Beavers G.M., Zeichner B.C. (2001) Susceptibility of sandflies to select insecticides in North Africa and Middle East. *American Mosquito Control* **17**, 23-32
- Théodoridès J. (1997) Note historique sur la découverte de la transmission de la leishmaniose cutanée par les phlébotomes. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* **90**, 177-178
- Thomaz-Soccol V., Lanotte G., Rioux J.A., Pratlong F., Martini-Dumas A., Serres E. (1993) Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **68**, 104-106
- Titus R.G., Ribeiro J.M.C. (1988) Salivary gland lysates from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* enhances *Leishmania* infectivity. *Science* **239**, 1306-1308
- Trinchieri G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews in Immunology* **3**, 133-146
- Turco, S.J. (1988) The lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Parasitology today*. **4**, 255-257
- Turco S.J., Späth G.F., Beverley S.M. (2001) Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends in Parasitology* **17**, 223-226
- Uzonna J.E., Bretscher P.A. (2001) Anti-IL-4 antibody therapy causes regression of chronic lesions caused by medium-dose *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *European Journal of Immunology* **31**, 3175-3184.



Uzonna J.E., Wei G., Yurkowski D., Bretscher P. (2001) Immune elimination of *Leishmania major* in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease. *Journal of Immunology* **16**, 6967-6974.

Vicente, A.D. (1990). Kala-Azar infantil. Dados epidemiológicos e incidência do Kala-azar no internamento de pediatria do Hospital Distrital de Faro. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, **13**: 173-182

Victoir K., Banuls A.L., Arevalo J., Llanos-Cuentas A., Hamers R., Noel S., De Doncker S., Le Ray D., Tibayrenc M., Dujardin J.C. (1998) The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. *Parasitology* **117**, 1-13

Waitumbi J., Warburg A. (1998) *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. *Infection and Immunity* **66**, 1534-1537

Walters L.L., Modi G.B., Tesh R.B., Burrage T. (1987) Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abnottensis* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **36**, 294-314

Watts A.M., Kennedy R.C. (1999) DNA vaccination strategies against infectious diseases. *International Journal for Parasitology* **29**, 1149-63

WHO (1980) Studies on leishmaniasis vectors/reservoirs and their control in the Old World: Part II. Middle East. WHO: Geneva WHO (1990) Control of the leishmaniasis. Report of a WHO committee. *WHO Technical Report Series* **793**. World Health Organization, Geneva, 177 pp.

WHO (1990) Control of the Leishmaniasis. Report of a WHO committee. *WHO Technical Report Series*, **793**, World Health Organization, Geneva, 177pp.

WHO (2002) *Leishmania* & HIV in gridlock. WHO/CTD. Geneva, 98.9 Add.I

Will A., Blank C., Röllinghoff M., Moll H. (1992) Murine epidermal Langerhans cells are potent stimulators of an antigen-specific T cell response to *Leishmania major*, the cause of cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Immunology* **22**, 1341-1347

Wilson M.E., Hardin, K.K., Donelson, J.E., (1989) Expression of the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani chagasi* in virulent and attenuate promastigotes. *Journal of Immunology*, **143**, 678-684

Wilson M.E., Sandor M., Blum A.M., Young B.M., Metwali A., Elliott D., Lynch R.G., Weinstock J.V. (1996) Local suppression of IFN- $\gamma$  in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. *Journal of Immunology* **156**, 2231-2239

Wolday D., Akuffo H., Demissie A., Britton S. (1999) Role of *Leishmania donovani* and its Lipophosphoglycan in CD4+ T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. *Infection and Immunity* **67**, 5258-5264

Yamakami K., Akao S., Sato M., Nitta Y., Miyazaki J., Tadakuma T. (2001) A single intradermal administration of soluble leishmanial antigen and plasmid expressing interleukin-12 protects BALB/c mice from *Leishmania major* infection. *Parasitology International* **50**, 81-91

York I.A., Rock K.L. (1996) Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annual Review of Immunology* **14**, 369-396

Zaffaroni E., Rubaudo L., Lanfranchi P., Mignone W. (1999) Epidemiological patterns of canine leishmaniasis [correction of leishmaniosis] in Western Liguria (Italy). *Veterinary Parasitology* **1**, 11-19

Zambrano-Villa S., Rosales-Borjas D., Carrero J.C., Ortiz-Ortiz L. (2002) How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in Parasitology* **18**, 272-278

Zhi Biao X., Le Blancq S., Evans D.A., Peters W. (1984) the characterization by isoenzyme electrophoresis of *Leishmania* isolated in the People's Republic of China. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **78**, 689-693